

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-104696

(43)公開日 平成8年(1996)4月23日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 11/04				
A 6 1 K 31/70	A C K			
	A D D			
C 0 7 H 1/02				
C 0 8 B 37/00		G 7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-121984	(71)出願人	000000228 江崎グリコ株式会社 大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号
(22)出願日	平成7年(1995)5月19日	(72)発明者	釜阪 寛 大阪府河内長野市上原町667-3
(31)優先権主張番号	特願平6-222368	(72)発明者	岡田 茂孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269
(32)優先日	平6(1994)8月11日	(72)発明者	日下 要 大阪府大阪市平野区長吉出戸6-6-15
(33)優先権主張国	日本(J P)	(72)発明者	山本 一也 兵庫県尼崎市東園田町2-129-401
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年4月10日、 日本栄養・食糧学会発行の「第49回日本栄養・食糧学会 大会講演要旨集」に発表		(72)発明者	芳川 憲司 大阪府高槻市西五百住町10-5
		(74)代理人	弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 リン酸化糖とその製造方法

(57)【要約】

【目的】 カルシウム、マグネシウム、あるいは鉄などのミネラルと反応してミネラルとの化合物または錯体を形成することにより、これらのミネラルを不溶化させない能力のあるリン酸化糖を提供すること、および、このリン酸化糖を肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤組成物、またはそれらの添加用組成物として広く提供すること。

【構成】 グルコース2個以上からなるグルカンに1個以上のリン酸基が結合しているリン酸化糖が提供される。リン酸化糖にタンパク質あるいはペプチドを結合させたリン酸化糖誘導体、およびリン酸化糖あるいはそれらの誘導体とアルカリ土類金属または鉄とを結合させた物質、およびそれらの製造方法もまた提供される。本発明により、上記リン酸化糖またはそれらの誘導体を含む肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分子内に少なくとも1個のリン酸基を有するリン酸化された糖であって、該糖が、グルカン、マンナン、デキストラン、寒天、シクロデキストリン、フコイダン、ジェランガム、ローカストビーンガム、グアーガム、タマリンドガム、およびキサントガムからなる群から選択される糖である、リン酸化糖。

【請求項2】 前記糖がグルカンであり、該グルカン1分子あたり少なくとも1個のリン酸を有する、請求項1に記載のリン酸化糖。

【請求項3】 前記糖がグルカンであり、該グルカンが、 $\alpha-1, 4$ 結合した3~5個のグルコースからなり、そして該グルカンに1個のリン酸基が結合している、請求項1に記載のリン酸化糖。

【請求項4】 前記糖がグルカンであり、該グルカンが、 $\alpha-1, 4$ 結合した2~8個のグルコースからなり、そして該グルカンに2個のリン酸基が結合している、請求項1に記載のリン酸化糖。

【請求項5】 前記糖がグルカンであり、該グルカンが、 $\alpha-1, 4$ 結合したグルコースを主鎖とし、 $\alpha-1, 6$ 結合および/または $\alpha-1, 4$ 結合したグルコースを側鎖とする、請求項1に記載のリン酸化糖。

【請求項6】 請求項1から5のいずれかに記載のリン酸化糖とタンパク質あるいはペプチドとを結合させた、リン酸化糖誘導体。

【請求項7】 請求項1から5のいずれかに記載のリン酸化糖あるいは請求項6に記載のリン酸化糖誘導体とアルカリ土類金属または鉄とを結合させた、リン酸化糖誘導体。

【請求項8】 リン酸基を有する澱粉または化工澱粉を分解して生成する、請求項2から5のいずれかに記載のリン酸化糖の製造方法。

【請求項9】 リン酸基を有する澱粉または化工澱粉に、澱粉分解酵素、糖転移酵素、あるいは α -グルコシダーゼ、あるいは、それら1種以上の組み合わせ（但し、 α -グルコシダーゼ1種のみを除く）を作用させる、請求項2から5のいずれかに記載のリン酸化糖の製造方法。

【請求項10】 前記澱粉分解酵素が α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、ブルアナーゼ、あるいはネオブルアナーゼ、あるいは、それらの組み合わせから選択される、請求項9に記載のリン酸化糖の製造方法。

【請求項11】 前記糖転移酵素がシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである、請求項9に記載のリン酸化糖の製造方法。

【請求項12】 請求項2から5のいずれかに記載のリン酸化糖に糖転移酵素を作用させる、リン酸化糖の製造方法。

【請求項13】 前記糖転移酵素がシクロデキストリン

グルカノトランスフェラーゼである、請求項12に記載のリン酸化糖の製造方法。

【請求項14】 リン酸化糖にアルカリ土類金属の塩または鉄の塩を作用させる、請求項8に記載のリン酸化糖の誘導体の製造方法。

【請求項15】 請求項1から5のいずれかに記載のリン酸化糖、あるいは請求項7または8に記載のリン酸化糖誘導体を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物。

【請求項16】 請求項1から5のいずれかに記載のリン酸化糖、あるいは請求項6あるいは7に記載のリン酸化糖誘導体と、リン酸化糖とが結合している物質を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物。

【請求項17】 リン酸化糖体またはその誘導体を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、リン酸化された糖（以下、リン酸化糖と称する）に関する。さらに本発明は、リン酸化糖とタンパク質またはペプチドとの複合体であるリン酸化糖誘導体、もしくはリン酸化糖あるいはリン酸化糖誘導体とアルカリ土類金属あるいは鉄との複合体であるリン酸化糖誘導体に関する。これらのリン酸化糖あるいはリン酸化糖誘導体は、カルシウムなどのアルカリ土類金属または鉄の沈殿阻害効果（以下、可溶化という）、あるいはカルシウムの吸収促進作用を有している。従って、本発明は、食品、飲料、飼料、あるいは肥料に含まれるまたは含有させたカルシウムなどのアルカリ土類金属、または鉄の生体への吸収を促進させることによって、ヒトや動物の健康を増進して各種の疾患を予防する原料、飲食用組成物、食品添加用組成物、あるいは飼料の原料または組成物として有用である。本発明はまた、植物へのカルシウムの吸収を促進して、植物あるいは果実の日持ちを向上させる肥料の原料や組成物に関する。さらに、本発明は、虫歯の予防効果を有しており、詳細には食品、飲料、飼料はもとより、練り歯磨き、マウスウォッシュ、トローチなどの口腔用組成物にも添加され得る。本発明は、種々のスケール、特にカルシウム系およびマグネシウム系スケールの発生を防止または抑制し得るスケール防止剤として使用され得る。

【0002】

【従来の技術】食品から摂取すべき栄養素の中で、ミネラルは、骨、神経、および筋肉の機能を維持するために欠くことができない。しかし、このミネラルは現在の食生活においては不足しがちで、このため健康上への影響が問題となっている。

【0003】例えば、カルシウムの平均摂取量は栄養所要量に達していない。所要量が600mgと高く設定さ

れているのは、以下に示すような理由で体内でのカルシウム吸収率が極めて低いからである。このため、吸収率を高めることが重要である。カルシウムはアルカリ性領域において無機リン酸と結合して不溶性の沈澱（リン酸カルシウム）を形成することが知られている。腸内の環境は微アルカリ性であり、かつ最近の加工食品には無機リン酸が多く含まれている。従って、摂取されたカルシウムは、リン酸カルシウムとなり沈澱を生じる。このため腸管からのカルシウムの吸収が妨げられる。

【0004】カルシウムを腸内環境下において腸管から効率よく吸収させることは、重要な課題である。特に、成長期の子供や妊婦は、より多くのカルシウムを摂取する必要がある。また、高齢になるに従って腸管の機能が低下し、カルシウムの吸収力が低下する結果発症する骨粗鬆症も深刻な問題である。カルシウムを多く含む食品には、牛乳、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、およびいわし、えびなどの魚介類の干物、佃煮があるが、嗜好の問題や咀嚼力の低下から摂取されにくい場合も多い。

【0005】鉄分の摂取については、2価鉄は酸化されて3価鉄に変化しやすい。酸化型の鉄は、中性からアルカリ性域で凝集して沈澱を形成するため生体で吸収され難くなる。また、鉄はそれが含まれる食品によってその吸収性が大きく異なるために、偏食しがちな現代人の摂取量は十分とは言えない。特に、女性は鉄の需要が高いので、摂取量が少ないことは問題である。

【0006】マグネシウムについても、マグネシウム塩はカルシウム塩と同様、不溶性であるため、その生体内への吸収率は比較的低く、特に成長期の子供や妊婦において、摂取量が不足することは問題である。さらに、マグネシウムも、鉄と同様に食事内容の影響を受けやすい。

【0007】これらのミネラルは、特に成長期の子供や妊婦において不足することが多く、これらをより多く摂取する必要がある。さらに今日、ダイエットや偏食の問題が大きく、嗜好食品においても、カルシウムと同様に鉄やマグネシウムの有効な生体への吸収を考慮した食品が期待され、これらの吸収を促進する摂取方法を開発することは重要である。

【0008】以上のような目的でカルシウム、マグネシウム、鉄などを飲料類に添加した場合に、保存中に沈澱が発生して有効な成分が損失することが問題となっている。また、カルシウムの過剰投与は、タンパク質の利用性低下（五島ら、栄養と食糧、32巻、1～11頁、1979年）あるいはミネラルの利用性低下（内藤ら、日本栄養食糧学会誌、39巻、433～439頁、1986年）を引き起こすことが知られている。

【0009】畜産業界では、生産性向上のため、ブロイラー、豚などは急激な成長が求められるため、骨の発育が追いつかず脚弱、奇形などの問題が起きている。カルシウムは特に、骨、卵殻質改善、牛乳のカルシウム

強化、鰻の骨曲がり防止などの目的で補給されているが、カルシウムの利用率が悪いことが大きな問題となっている。

【0010】植物にとってもカルシウムは重要な要素であり、EDTA-カルシウムなどのキレートカルシウムの投与によって、細胞壁の強化あるいはエチレングスの発生抑制などの作用による老化抑制効果および日持ち性の向上が知られている（K. Tanakaら、J. Japan. Soc. Hort. Sci., 61巻、183～190頁、1992年）。しかし、EDTA-カルシウムは毒性を有するため、毒性のない安全で有効なキレート剤の開発が望まれている。

【0011】カルシウムが腸内環境下において不溶化しないようにすることにより、腸管から効率よく吸収させることを目的として、カルシウムと化合物を形成する能力のある物質が開発され利用されている。例えば、カゼインホスホペプチド（CPP）を飲料または食品に添加する技術（特開平3-240470号公報、特開平5-284939号公報）、クエン酸カルシウム・リンゴ酸カルシウム複合体のカルシウム可溶性効果（特開昭56-97248号公報）、ペクチン酸カルシウムの骨強度増強作用（特開平6-7116号公報）などが知られている。これらの化合物は、一部食品にも既に利用されている。しかし、用途によっては使用に制限があり、必ずしも満足のいくものではない。

【0012】例えば、カゼインホスホペプチドはカルシウムの吸収効果が大きく、比較的に食品に利用されている。このペプチドは、乳汁に含まれる乳タンパク質を構成する。しかし、乳汁中に占めるその含量が少なく、分画が容易でないために、大変高価である。さらに、精製が不十分な製品では、苦味のあるペプチドの混入が多いため、味覚上好ましくない。

【0013】酸性多糖または酸性蛋白質もまたカルシウムと化合物を形成する能力を有することが知られている。これらの多糖またはタンパク質は高分子であり、食品に添加した際に粘度上昇を引き起こすため、その用途は制限される。さらに、リンゴ酸、酒石酸などの有機酸は、安価ではあるが、食品にこれらを添加した際に官能的に好ましくない味質を示す。これらはまた酸であることから、歯のエナメル質の脱灰を引き起こすことがあり、歯を健康に保つ上で問題がある。

【0014】歯石および歯垢は、歯肉炎、歯周炎、あるいはう蝕の原因になることが知られている。歯石形成の詳細については必ずしも明らかにされていないが、プラークを構成する細菌、唾液糖タンパク質などの有機基質に、唾液および浸出液から供給されるカルシウムまたはリンが沈着し、結晶化する石灰化現象と考えられる。既存の歯石防止剤としては、ピロリン酸ナトリウムあるいはトリポリリン酸ナトリウムに関する、三宅ら（日歯周誌、第30巻、3号、860～867頁）の提案がある。う蝕は、ミュータンス菌（6715株）が砂糖を栄養源として、

酵素グルコシルトランスフェラーゼ（以下G T a s eと略する）の作用により、非水溶性のグルカンをつくることから始まる。このグルカンが歯の表面を覆うために、歯垢が生じる。この歯垢の内部でミュータンス菌が酸発酵を起こすと、歯が溶け出して虫歯となる。非う蝕の糖としては、ミュータンス菌の栄養源にならないいくつかのオリゴ糖（S.Hamadaら、J.Jpn.Soc.Starch Sci.、31巻、83-91頁、1984年）が既に提案されている。さらに、抗う蝕剤として茶の成分であるポリフェノールが報告され利用されている（S.Sakanakaら、Fragrance Journal、11巻、42-49頁、1990年）。しかし、ポリフェノールの利用もまた味覚の問題があり、用途は制限されている。歯石と歯垢との両方に効果を持つ物質はいまだ開発されていない。

【0015】一般的に、オリゴ糖の性質として低カロリーおよび整腸作用が多く報告されているが、リン酸化糖に関する報告はない。

【0016】糊化した澱粉は、高い粘性を有する。これは、澱粉中のアミロペクチンが、房状構造が多数連なった非常に長い分子であることに起因する。糊化した澱粉は、高い粘性を有するため、澱粉を原料としてマルトースあるいはシクロデキストリンなどを製造する場合に、取り扱いが困難であるという問題がある。例えば、一定濃度以上の糊化した澱粉をパイプを用いて輸送する場合には、パイプが詰まることがある。

【0017】このように、既存の澱粉が有する性質（溶解性の低さ、老化性、および高粘度）は、食品およびその他の産業において、澱粉の利用を制限した。そこで、酵素処理、化学処理、または物理的処理を行って澱粉を低分子化させることにより、溶解性および耐老化性を向上させる研究が行われ、ある程度は、老化を抑制できるようになった。しかし、過剰な分子量低下を抑えることは困難であり、本来高分子である澱粉の持つ固有の性質を失うという問題が生じている。

【0018】各種工業用水系でのスケール生成は、高温水系、非高温水系を問わず深刻な問題である。例えば、水系が加熱されると、溶存しているカルシウム、マグネシウムのような金属イオンが不溶性の化合物に変化しやすく、水系と接触している伝熱面上などにスケールとして析出する。この傾向は、ボイラー、海水淡水化装置系、地熱熱水の利用装置系などの高温水系の場合顕著であり、熱効率の低下、水路の閉塞などの障害を引き起こす。

【0019】植物が貯蔵する澱粉の多くには、澱粉を構成するグルコースに一部リン酸基がエステル結合している。澱粉中のリン酸含有量としては微量であるが、芋類の澱粉には比較的多く、中でも馬鈴薯澱粉はリン酸基を多く含んでおり、リン酸含有量の非常に高い品種も存在している（矢木敏博ら、澱粉化学、20巻、51頁、1973年）。馬鈴薯澱粉中では、これを構成するグルコース残

基の3位および6位にリン酸基が比較的多くエステル結合していることが知られている（Y.Takedaら、Carbohydrate Research、102巻、321-327頁、1982年）。このような澱粉をアミラーゼなどの澱粉分解酵素を用いて分解する場合、澱粉構造中のリン酸基がエステル結合したグルコース残基の近傍には酵素が作用できない。従って、糖化終了時点で、リン酸化糖は未分解で残ることが知られる。このため、リン酸化糖は、オリゴ糖、麦芽糖、グルコースなどを生産する澱粉糖化産業において、リン酸化糖の組成を知らないままに廃棄物として処分されていることもまた知られていた。

【0020】澱粉糖化産業においては、糖化した液から糖化に用いた酵素および残存するリン酸化糖を除去することを目的として、糖液をイオン交換樹脂に通す工程が用いられている。

【0021】この工程において、イオン交換樹脂に吸着したリン酸化糖は、樹脂の再生を目的とした水酸化ナトリウム溶液によるイオン交換樹脂の洗浄の際に樹脂から溶出される。このリン酸化糖を含む洗浄後の液は、廃液として処分されてきた。この廃液は、強アルカリ性であるため、その中に含まれるリン酸化糖が分解されてリン酸と中性糖になる、あるいは糖の還元末端が酸化されるなどの反応が起こるため、廃液中のリン酸化糖の残存率は低かった。

【0022】他方、リン酸を化学的に結合させた澱粉（以下、化工澱粉という）もまた知られている。リン酸化澱粉を食品に用いる場合、食品添加物の規格に従うと、食品添加物として認可されるためには、結合リンとして0.2～3%であって、しかも澱粉と結合していない遊離の無機リン含量が全リンの20%以下であることが要求される。

【0023】他方、リン酸化糖または化工澱粉とカルシウムなどのアルカリ土類金属または鉄との化合物または錯体の形成に関する研究、リン酸化糖によるカルシウムなどのアルカリ土類金属や鉄の生体における吸収促進に関する研究、およびリン酸化糖による洗浄剤および歯石防止剤としての研究は、これまでに全くなされていない。

【0024】

【本発明が解決しようとする課題】カルシウム、マグネシウム、あるいは鉄などのミネラルと反応してミネラルとの化合物または錯体を形成することにより、これらのミネラルを不溶化させない能力のあるリン酸化糖を提供すること、および、このリン酸化糖を肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤組成物、またはそれらの添加用組成物として広く提供することである。

【0025】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、リン酸化糖に着目し、かかる状況下において鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成した。

【0026】本発明のリン酸化糖は、分子内に少なくとも1個のリン酸基を有する。上記糖は、グルカン、マンナン、デキストラン、寒天、シクロデキストリン、フコイダン、ジェランガム、ローカストビーンガム、グアーガム、タマリンドガム、およびキサンタンガムからなる群から選択される。

【0027】好ましい実施態様では、本発明のリン酸化糖は、上記糖がグルカンであり、このグルカン1分子あたり少なくとも1個のリン酸を有する。

【0028】さらに別の好ましい実施態様では、本発明のリン酸化糖は、上記糖がグルカンであり、このグルカンが、 $\alpha-1$, 4結合した3~5個のグルコースからなり、そしてこのグルカンに1個のリン酸基が結合している。

【0029】さらに別の好ましい実施態様では、本発明のリン酸化糖は、上記糖がグルカンであり、このグルカンが、 $\alpha-1$, 4結合した2~8個のグルコースからなり、そしてこのグルカンに2個のリン酸基が結合している。

【0030】さらに別の好ましい実施態様では、本発明のリン酸化糖は、上記糖がグルカンであり、このグルカンが、 $\alpha-1$, 4結合したグルコースを主鎖とし、 $\alpha-1$, 6結合および/または $\alpha-1$, 4結合したグルコースを側鎖とする。

【0031】さらに本発明は、タンパク質あるいはペプチドとを結合したリン酸化糖に関する。

【0032】また、本発明は、リン酸化糖またはリン酸化糖誘導体に、アルカリ土類金属または鉄と結合したリン酸化誘導体に関する。

【0033】本発明のリン酸化糖の製造方法は、公知の糖類をリン酸化する方法が用いられ得る。

【0034】好ましい実施態様では、糖がグルカンの場合には、リン酸基を有する澱粉または化工澱粉を分解して得られ得る。

【0035】好適な実施態様では、リン酸基を有する澱粉または化工澱粉に、澱粉分解酵素、糖転移酵素、または α -グルコシダーゼ、あるいはそれらの1種以上の組み合わせ(但し、 α -グルコシダーゼ1種のみを除く)を作用させる。

【0036】好ましい実施態様では、上記澱粉分解酵素は、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、プルラナーゼ、またはネオプルラナーゼの1種以上の組み合わせからなるものである。好ましい実施態様では、上記糖転移酵素は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

【0037】好ましい実施態様では、上記製造方法は、本発明のリン酸化糖に糖転移酵素を作用させる。上記糖転移酵素がシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

【0038】本発明のリン酸化糖の誘導体は、リン酸化

糖またはリン酸化糖誘導体にアルカリ土類金属の塩または鉄の塩を作用させて製造される。

【0039】本発明によれば、上記リン酸化糖またはそれらの誘導体を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物が提供される。

【0040】本発明によれば、上記リン酸化糖またはそれらの誘導体と、リン酸化糖とが結合している物質を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物もまた提供される。

【0041】本発明によれば、リン酸化糖体またはその誘導体を含む、肥料、飼料、食品、飲料、口腔用組成物、洗浄剤用組成物、またはそれらの添加用組成物もまた提供される。

【0042】以下に、本発明について詳細に記述する。

【0043】本発明においてリン酸化糖とは、分子内に少なくとも1個のリン酸基を有するリン酸化された糖をいう。また本願において中性糖とは、リン酸基が結合していない糖をいう。

【0044】本発明のリン酸化糖の製造原料である糖としては、グルカン、マンナン、デキストラン、寒天、シクロデキストリン、フコイダン、ジェランガム、ローカストビーンガム、グアーガム、タマリンドガム、およびキサンタンガムが挙げられる。以下、グルカンの場合について説明する。一般の粗製植物澱粉、好ましくは馬鈴薯の粗製澱粉などのリン酸基が多く結合した澱粉が適しているが、精製品でもよい。化工澱粉もまた、好適に用いられ得る。さらに、リン酸基を化学的に結合させた各種糖質を用いることもまた可能である。馬鈴薯澱粉中では、これを構成するグルコースの3位および6位にリン酸基が比較的多くエステル結合している。リン酸基は主にアミロペクチンに存在する。

【0045】澱粉などの酵素的分解には、澱粉分解酵素である α -アミラーゼ(E C 3.2.1.1)、 β -アミラーゼ(E C 3.2.1.2)、グルコアミラーゼ(E C 3.2.1.3)、イソアミラーゼ(E C 3.2.1.68)、プルラナーゼ(E C 3.2.1.41)、およびネオプルラナーゼ(Kurikiら、Journal of Bacteriology、170巻、1554頁-1559頁、1988年)、ならびに糖転移酵素であるシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(E C 2.4.1.19; 以下CGTaseと略する)をそれらのうち1種以上作用させ、または、それら1種以上と α -グルコシダーゼ(E C 3.2.1.20)を併用する。

【0046】イソアミラーゼあるいはプルラナーゼで分解することにより、澱粉中の $\alpha-1$, 6分枝構造を切ることによって、分枝構造を有しないリン酸化糖を得ることができるし、これらの酵素を用いなければ、 $\alpha-1$, 6分枝構造を有するリン酸化糖を得ることもできる。また、グルコアミラーゼで分解することにより、非還元末

端に結合したリン酸化されていないグルコースを順次遊離させることができる。このような酵素処理を行うことで、精製後のリン酸化糖の分子量あたりのリン酸基数を増減させることが可能となる。

【0047】すなわち、高いリン酸含量のリン酸化糖が必要であれば、多い酵素量で長時間反応させればよく、それほど高いリン酸含量のリン酸化糖が必要でなければ、少ない酵素量で短時間で反応させればよい。

【0048】酵素による分解は複数種の酵素を同時に反応させることにより、同時に進行させ得る。簡単に言えば、原料となる澱粉を、水、または酵素が作用できるpHに調整した緩衝液に溶解する。この反応液に、液化型 α -アミラーゼ、プルラーゼ、グルコアミラーゼなどを同時に加えて、加熱を行うことにより反応させる。この方法を用いると、澱粉を糊化させながら、中性糖を遊離すること、リン酸化糖の非還元末端に結合したリン酸化されていないグルコースを遊離させること、あるいはリン酸化糖構造中の原料に由来する α -1, 6分枝構造を切断することができる。この方法により、2段階の反応ではなく、1段階の反応でリン酸含量を高めたリン酸化糖が得られる。

【0049】複数種の酵素を個別の工程で作用させることにより2段階以上の酵素反応をさせる場合においては、作用させる酵素の順序は特定されない。しかし、澱粉の濃度が高い場合、最初に液化型アミラーゼを含めた酵素を作用させるのが好ましい。最初にイソアミラーゼあるいはプルラーゼを作用させるとアミロース含量が増える。アミロースはアミロペクチンに比べて老化および沈澱しやすいため、原料が老化、沈澱してしまう。そして他の酵素による作用を受けなくなる。

【0050】使用する澱粉分解酵素、糖転移酵素、および α -グルコシダーゼの由来は特に問わない。例えば、 α -アミラーゼの由来としては、バチルス(Bacillus)属菌やアスペルギルス(Aspergillus)属菌由来の澱粉分解酵素製剤が好適に使用され得る。また、酵素の反応条件は、酵素が作用し得る温度およびpHであればよい。例えば、温度25℃～70℃、pH4～8が好適に用いられる。

【0051】まず原料となる澱粉を、水、または酵素の作用できるpHに調整した緩衝液に溶解する。この溶液に、液化型 α -アミラーゼを加え、加熱して反応させることにより、澱粉を糊化させつつ液化する。その後、温度20～80℃にて適当な時間保持する。作用させる液化型 α -アミラーゼ量は、澱粉を液化できる量であれば、少量でも過剰でも良い。好適な量としては、20～50,000Uである。また、この時の保持時間は、澱粉がその後の工程中において老化を起こさない程度まで液化されるならば、その長さは問わない。好ましくは、20～80℃で30分間保持される。

【0052】液化終了後、特に酵素を失活させる必要は

ないが、100℃で10分保持するなど常法により酵素を失活させてもよい。さらに、遠心分離あるいは膜濾過などの常法により不溶物を分離除去してもよい。その後、リン酸化糖を分画してもよいが、リン酸含量を高めたリン酸化糖を得るには、さらに以下の操作を行う。

【0053】簡単に言えば、原料を液化させた後、これに、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、プルラーゼ、および α -グルコシダーゼをそれぞれ同時にあるいは適当な順序で添加して糖化させ、例えば温度40～60℃で30分～40時間作用させて、原料から、中性糖およびリン酸化糖の非還元末端に結合したリン酸化されていないグルコースを遊離させ得、そしてリン酸化糖構造中の原料に由来する α -1, 6分枝構造を切断し得る。このグルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、プルラーゼを組み合わせて使用する場合、その組み合わせおよび添加順序は問わない。また、酵素の添加量および保持時間は、リン酸化糖に求められるリン酸含量などに応じて決定され得る。好ましくは、グルコアミラーゼは50～700U、イソアミラーゼおよびプルラーゼはそれぞれ2～100U、 α -グルコシダーゼは50～700U添加され得る。酵素は固定化しても好適に用いられ得る。

【0054】各酵素の反応終了後においては、特に酵素を失活させる必要はないが、100℃で10分保持するなど常法により酵素を失活させてもよい。さらに、遠心分離あるいは膜濾過などの常法により不溶物を分離除去してもよい。

【0055】リン酸化糖を含有する糖混合物からリン酸化糖を精製するために、リン酸化糖が中性糖とは異なりイオン性の物質であることから、陰イオン交換樹脂が用いられ得る。樹脂の種類は、特に限定するものではないが、キトパールBCW2500タイプ(富士紡製)、アンバーライト1RAタイプ(オルガノ製)、DEAE-セルロース(ワットマン製)、DEAE-セファデックス、QAE-セファデックス(ファルマシア製)、QAE-セルロース(バイオラッド製)などが好適に用いられ得る。適当なpHに調整した緩衝液を用いて、樹脂を平衡化する。例えば10～50mM程度の酢酸緩衝液(pH4～5)などの条件が好適に用いられ得る。平衡化した樹脂をカラムに詰め、リン酸化糖を含有する糖混合物をチャージする。中性糖を洗浄除去した後、吸着したリン酸化糖をアルカリ性の溶液または塩溶液を用いて溶出する。

【0056】リン酸化糖の溶出を溶出液のイオン強度を上昇させることによって行う場合、用いる塩の種類は特に問わない。例えば、塩化ナトリウム、重炭酸アンモニウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムのような塩が好適に用いられ得る。

【0057】リン酸化糖の溶出を溶出液のpHをアルカリに変化させることによって行う場合、用いるアルカリ

試薬の種類は特に問わない。例えば、アンモニア、炭酸ナトリウム、または水酸化ナトリウムが用いられ得る。しかし、強アルカリ条件下では、リン酸基が糖から離脱し、あるいは糖の還元末端が酸化される。従って、好ましくは、リン酸化糖の溶出は、弱酸性から弱アルカリ性の範囲のpHで行い、さらに好ましくはpH3～pH8の範囲で行う。

【0058】この場合、徐々に溶出液の塩濃度またはpHを高くしたり、あるいは段階的に塩濃度またはpHを上昇させてリン酸化糖を溶出することにより、リン酸化糖1分子当たり結合しているリン酸基の個数に応じてリン酸化糖の成分を分画することが可能となる。

【0059】リン酸化糖を含有する糖混合物からリン酸化糖を精製するには、陰イオン交換樹脂の代わりに活性炭もまた用いられ得る。用いる活性炭の種類は特に問わないが、好ましくは、カラムに充填可能な粒状活性炭が用いられる。グルコースを除く中性糖の吸着能が生じる条件となるように、緩衝液、酸、アルカリ、塩溶液、および蒸留水を用いて、活性炭を調製する。例えば粒径が均一で、脱気を施した活性炭を、カラムに充填し、蒸留水で洗浄したものなどが好適に用いられ得る。カラムに試料を供して中性糖を吸着させることにより、リン酸化糖を素通り画分に得ることができる。

【0060】リン酸化糖を含有する糖混合物からリン酸化糖を精製するには、炭素数1～3のアルコールを添加してリン酸化糖を沈澱させる方法もまた、用いられ得る。簡単に言えば、試料溶液にアルコールを添加することにより、リン酸化糖のみが沈澱として得られ得る。10%以上の糖濃度であれば容積比で3倍以上のアルコールを添加することが望ましい。

【0061】アルコールに加えて、金属塩、好ましくはカルシウム塩または鉄塩の存在下で、本発明のリン酸化糖はリン酸化糖誘導体を形成し、沈澱が生じやすくなる。このため、金属塩の存在下では、先に示したアルコールのみによる沈澱化に比べ、少量のアルコールでもリン酸化糖の回収が容易となる。好ましくはアルカリ条件下で実施する。用いる塩の種類は特に限定するものではないが、例えば、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、または塩化第一鉄が、溶解性もよく、好適に用いられ得る。アルコールを添加することで生じた沈澱の採取は、一般に使用される方法、例えば、デカンテーション、汙過、遠心分離などにより行われる。リン酸化糖と金属塩との化合物であるリン酸化糖誘導体の沈澱は、上述のようなアルコール沈澱で得られる。必要ならば、回収した沈澱を水あるいは適当な溶液に再溶解し、アルコールを再度添加する操作を繰返し行ってもよい。この操作により、中性糖および過剰の塩などの不純物が除去され得る。塩など不純物の除去には限外汙過膜もまた用いられ得る。

【0062】金属塩を添加し、沈澱物として得られたり

ン酸化糖誘導体から、金属塩を除去してリン酸化糖を製造し得る。金属体の除去は(脱塩)は定法により行われ得る。脱塩は、例えば卓上脱塩装置マイクロアライザーG3(旭化成(株)製)を用いると容易に行われ得る。

【0063】このようにして得られたリン酸化糖の溶液、リン酸化糖、またはリン酸化糖誘導体は、通常実施される乾燥方法、例えば熱風乾燥、流動層乾燥、真空乾燥などの方法を用いて、濃縮あるいは粉末にされ得る。必要に応じてアルコールを除去することにより、飲食に供し得るリン酸化糖あるいはリン酸化糖誘導体、または施肥、洗浄に供し得るリン酸化糖またはリン酸化糖誘導体が得られ得る。

【0064】化工澱粉を用いる場合、モノエステル型は一般に乾式法で製造され、ジエステル型は湿式法で製造され得る。結合させるリン酸基数は条件によって変動し得る。食品添加物規格に基づく、結合リン酸基が重量比で3%以下程度であることが食品としては好ましい。しかし、飼料、肥料、または洗浄剤に用いる場合にはこの限りではない。天然に存在する澱粉に比べて化工澱粉ではリン酸基が多く結合しており、酵素作用産物として得られるリン酸化糖の重合度は大きく、そしてその結合リン酸含有量は高い。従って、化工澱粉では、先に示したアミラーゼなどの酵素処理によって、結合リン酸基数がリン酸化糖1分子当たり1個のものから複数個のものまでが生成される。それゆえ化工澱粉より生産されたリン酸化糖のカルシウム、鉄、マグネシウムとの化合物形成能は、結合リン酸基数の上昇につれて高くなる。

【0065】得られたリン酸化糖の構造は以下のように分析できる。

【0066】まず、リン酸化糖からリン酸基を除去する。例えばリン酸化糖溶液と10mM塩化マグネシウム、0.3mM塩化亜鉛、および0.05%アジ化ナトリウムを含む60mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.4)とを混合し、これにアルカリホスファターゼ(E.C. 3.1.3.1; E.coli由来; シグマ社製)を添加して、適当な温度で適当な時間(例えば40℃で18時間)反応させる。限外汙過膜を用いてアルカリホスファターゼを除去することにより反応を停止し、リン酸基が除去された糖(以下、脱リン酸化糖と言う)を成分とする反応液(以下反応液Aという)を得る。

【0067】得られた反応液Aに対し、例えば200mM酢酸緩衝液(pH4.8)に溶解したβ-アミラーゼ(さつまいも由来; シグマ社製)を添加して、適当な温度で適当な時間(例えば37℃で2時間)反応させる(以下、この液を反応液Bという)。同様に、反応液Aに60mM酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解したグルコアミラーゼ(Rhizopus由来; 東洋紡績製)を添加して、適当な温度で適当な時間(例えば35℃で18時間)反応させる(以下、この液を反応液Cという)。

【0068】反応液A～Cを分析して生成物を確認する。これらの反応液内の生成物は、陰イオン交換樹脂カラムCarboPac PA-100（φ4×250mm、ダイオネックス社製）による高速液体クロマトグラフィーまたはシリカゲルを用いた薄層クロマトグラフィーを用いて分析し、各種重合度の標準マルトオリゴ糖と比較することにより確認され得る。高速液体クロマトグラフィーを用いた脱リン酸化糖の溶出は、100mMの水酸化ナトリウムを基本溶液として1M酢酸ナトリウム濃度を上昇させることによって行なわれ得る。検出はパルスドアンペロメトリー（ダイオネックス社製）を用いて行われ得る。薄層クロマトグラフィーによる脱リン酸化糖の分析は、脱リン酸化糖をアセトニトリル／水＝80／20で多重展開した後、硫酸／メタノール＝1／1の溶液を噴霧し、130℃で3分間保持することにより行なわれ得る。

【0069】反応液Aを分析すれば、リン酸化糖の鎖長が確認できる。反応液Bを分析したときにマルトースの

（1分子当たりの平均結合リン酸基数）＝

$$\frac{[\text{湿式灰化後定量された無機リン酸(mol)}]}{[\text{全リン酸化糖中の全糖量(g)}] / [\text{DPから計算した脱リン酸化糖の平均分子量}]}$$

【0072】例えば、馬鈴薯澱粉に α -アミラーゼについてグルコアミラーゼ、イソアミラーゼあるいはプルラーゼを作用させることにより、グルコースが α -1, 4結合したリン酸化糖（重合度2以上8以下）が得られる。得られるリン酸化糖は、前述の陰イオン交換樹脂を用いる精製法によって、グルコースが α -1, 4結合したグルカンに1分子あたり1個のリン酸基が結合したものと、グルコースが α -1, 4結合したグルカンに1分子あたり2個以上のリン酸基が結合したものと2種のリン酸化糖のグループに区別され得る。

【0073】上記のようにグルコアミラーゼを作用させて得られるリン酸化糖は、リン酸基がグルコースの6位に結合していれば、その直前まで非還元末端側から切断され得る。従って、このリン酸化糖は、6位に結合したグルコースを非還元末端に有するオリゴ糖あるいは少なくとも非還元末端側から2個目のグルコースの6位に結合している構造になる。リン酸基がグルコースの3位に結合していれば、非還元末端側から2個目のグルコースの3位に結合している構造になる。これは、松作ら（*Biochimica et Biophysica Acta*, 749巻、302～311頁、1983年）のグルコアミラーゼの特性から明らかとなっている。

【0074】このようなグルコースが α -1, 4結合したグルカンに1分子あたり1個のリン酸基が結合したリン酸化糖にCGTaseを作用させると、さらにカルシウム可溶性効果の高いリン酸化糖が得られ得る。

【0075】これらのリン酸化糖は、これまでに製造されたことがなく、本発明によって初めて分画され、その

み、あるいはマルトースとマルトトリオース（およびわずかにグルコース）が検出されれば、この脱リン酸化糖はグルコースが α -1, 4結合したグルカンであることが確認できる。さらに反応液Cを分析したときにグルコースのみが検出されれば、この脱リン酸化糖は α -結合したグルコースからなることが確認できる。

【0070】糖の平均鎖長（以下グルコースを1単位としてDPで表す。）は、脱リン酸化糖を構成する各重合度の糖含量から求められ得る。全リン酸化糖中の全糖量はフェノール硫酸法により定量し、結合リン酸基数は湿式灰化後、無機リン酸として定量され得る（澱粉関連糖質実験法、生物化学実験法19、中村道徳ら、31頁、1986年、学会出版センター）。1分子当たりの結合リン酸基数は、湿式灰化後定量された無機リン酸量と、DPより下式を用いて算出される。

【0071】

【数1】

構造が明らかとなったものである。また、グルコースが α -1, 4結合したグルカンに、1分子あたり2個以上のリン酸基が結合したものはこれまでその存在も知られていなかった。

【0076】このようにして分画したリン酸化糖の構造を分析した結果、馬鈴薯澱粉から各種糖液を生産する時に処分されてきた廃液に存在することもまた判明した。澱粉糖化産業においては、このようなリン酸化糖は陰イオン交換樹脂によって吸着されるが、このリン酸化糖は、目的産物ではなく、陰イオン交換樹脂の再生時に強アルカリ性の液にて溶出されるために分解してしまっている。

【0077】以上のように調製されたリン酸化糖は、以下のような性質を有する。

【0078】（1）糖質に結合しているリン酸基が、カルシウムなどのアルカリ土類金属および鉄との親和性が高く、それら金属類の沈澱を防ぐことができる。

【0079】（2）カルシウムなどのアルカリ土類金属および鉄の生体への吸収を促進する効果を有する。

【0080】（3）虫歯の原因であるミュータンス菌に資化されない非う蝕性の糖であり、グルカンの生成を行わない。

【0081】（4）pHの緩衝能があり、炭酸カルシウムの存在下で相乗作用が生じて、緩衝能力が高まる。

【0082】（5）生体内酵素では消化され難く、そしてカロリーに成りにくい難消化性糖である。

【0083】（6）澱粉の老化を防ぐ効果を有する。

【0084】（7）無味無臭である。

【0085】これらの効果は、馬鈴薯由来の澱粉から得たリン酸化糖に限らず、例えば、酵母由来のリン酸化されたマンナンによっても提供される。デキストラン、寒天、シクロデキストリン、フコイダン、ジェランガム、ローカストビーンガム、グアーガム、タマリンドガム、あるいはキサントランガムのリン酸化糖もまた同様の効果を有する。さらに、糖質の種類によらずリン酸化されていれば、以上の性質を有する糖質を提供できる。ただし、リン酸基を化学的に結合させた糖質は、先に述べたように食品添加物規格の使用制限を受けるが、食用以外はその限りではない。

【0086】本発明のリン酸化糖は、タンパク質あるいはペプチドと複合体を形成し得、リン酸化糖の誘導体とし得る。糖質のタンパク質とのメイラード反応を利用した複合体の作製は古くから行われてきた。このメイラード反応は、通常の食品調理中にも起こる反応であり、反応産物は生体に安全である。その反応は、糖質の還元性末端がタンパク質のアミノ基に脱水縮合することによって起こる。多糖の場合はタンパク質1分子に糖1~2分子が結合し、単糖の場合はほとんどのタンパク質のアミノ基に糖が結合することが可能である(A. Katoら、American Chemical Society、16巻、213~229頁、1991年)。また、その機能として、タンパク質の熱安定性およびpH安定性の向上、乳化特性の付与、あるいは水に不溶性のタンパク質の可溶化などが報告されている(A. Katoら、J. Agric. Food Chem.、39巻、1053~1056頁、1991年)。最近、グルコース-6-リン酸をタンパク質に結合させることにより、カルシウム可溶化効果が得られることもまた判った(T. Aokiら、Biosci. Biotech. Biochem.、58巻、9号、1727~1728頁、1994年)。しかし、単糖は反応性が高く、タンパク質の変性もまた起こるので、その効果および安定性は満足のいくものではない。また、本発明のリン酸化糖を用いたタンパク質との誘導体に関する報告も全く行われていない。

【0087】本発明のリン酸化糖のタンパク質との誘導体を用いた場合、タンパク質の変性がグルコース-6-リン酸を用いた場合よりも極めて少なく、安定的に長時間、カルシウムを可溶化することが明らかとなった。これは、特に、オリゴ糖の場合、単糖に比べて反応が緩やかに進み、タンパク質へのダメージが少ないためと思われる。タンパク質に容易に有機リガンドを結合させ得る方法として優れた方法である。用いるタンパク質は特に問わないが、安価に入手でき、食品として安全なものが好ましい。このようなタンパク質としては、例えば、卵白アルブミン、カゼイン、小麦タンパク質、大豆タンパク質などが挙げられる。それらを加水分解したペプチドもまた好適に用いられ得る。

【0088】本発明のリン酸化糖により、肥料、飼料または食品の摂取におけるカルシウムの吸収を促進し得る。またリン酸化糖がカルシウムその他のアルカリ土類

金属や鉄とも化合物または錯体を形成し、それらの生体への吸収を促進することが可能となる。アルカリ土類金属としては、カルシウムの他に、マグネシウム、亜鉛、セレンが挙げられる。従って、骨粗鬆症などのカルシウム不足からくる疾患の予防も期待できる。さらに今日、ダイエットや偏食の問題が大きく、嗜好食品においてもカルシウムと同様に鉄およびマグネシウムの有効な生体への吸収を考慮した食品が期待され、これらの吸収を促進する摂取方法を開発することは重要である。本発明のリン酸化糖またはリン酸化糖誘導体は、安全であり、難消化性であり、かつ低カロリーである。このリン酸化糖はまた、多くのオリゴ糖に報告されているようにビフィズス菌増殖効果および整腸作用も期待できる。

【0089】さらに、金属を可溶化させる効果が生体に安全な領域において行われるため、金属が沈着したことが原因とされる汚れに対して効果的かつ安全な洗浄剤、もしくはカルシウムが歯に沈着することによって発生する歯石の発生防止剤として、本発明のリン酸化糖を用いることが可能である。また、本発明のリン酸化糖のカルシウムおよびリンが沈着し結晶化する石灰化現象を抑制する性質は、歯石の発生を防止する。さらに、上記リン酸化糖はまた、う蝕の原因であるミュータンス菌の栄養源にならず、非水溶性のグルカンを生じない糖質である。従って、歯垢が生じず、ミュータンス菌の酸発酵も起こさない。さらに、本発明のリン酸化糖は緩衝作用を有し、pHの低下を防ぐ効果をも有する。従って、リン酸化糖は、食品または口腔組成物において、風味に影響を与えることなく、歯垢内の発酵産物である乳酸によるpHの低下を防ぐ効果を有する。リン酸化糖は、練り歯磨き、マウスウォッシュ、トローチなどの口腔用組成物などに添加され得る。また本発明により、リン酸化糖がカルシウムその他のアルカリ土類金属、あるいは鉄と複合体を形成し、生体への吸収を促進することが可能となると同様に、アルカリ土壌およびアルカリ条件下における植物へのカルシウムなどの微量金属の吸収を促すこともまた可能となる。例えば、本発明により、切り花、果樹、果実の老化抑制および日持ち向上に効果のある、安全なカルシウム吸収促進剤を提供できる。金属を吸着する性質は、金属類の沈着を防止するスケール防止剤や洗浄剤としても有効である。

【0090】以上により、本発明のリン酸化糖あるいはそれらの誘導体は、以下のような用途に好適に用いられ得る。

【0091】本発明のリン酸化糖は、ほとんど全ての飲食用組成物または食品添加物用組成物に使用することが可能である。この飲食用組成物とは、ヒトの食品、動物あるいは養魚用の飼料、ペットフードを総称する。すなわち、コーヒー、紅茶、日本茶、ウーロン茶、ジュース、加工乳、スポーツドリンクなどの液体および粉末の飲料類、パン、クッキー、クラッカー、ビスケット、ケ

ーキ、ピザ、パイなどのベーカリー類、スパゲティー、マカロニなどのパスタ類、うどん、そば、ラーメンなどの麺類、キャラメル、ガム、チョコレートなどの菓子類、おかき、ポテトチップス、スナックなどのスナック菓子類、アイスクリーム、シャーベットなどの冷菓類、クリーム、チーズ、粉乳、練乳、乳飲料などの乳製品、ゼリー、プリン、ムース、ヨーグルトなどの洋菓子類、饅頭、ういろ、もち、おはぎなどの和菓子類、醤油、たれ、麺類のつゆ、ソース、だしの素、シチューの素、スープの素、複合調味料、カレーの素、マヨネーズ、ケチャップなどの調味料類、カレー、シチュー、スープ、どんぶりなどのレトルトもしくは缶詰食品、ハム、ハンバーグ、ミートボール、コロッケ、餃子、ピラフ、おにぎりなどの冷凍食品および冷蔵食品、ちくわ、蒲鉾などの水産加工食品、弁当のご飯、寿司などの米飯類にも効果的に利用できる。さらに、カルシウムの吸収のよさを利用して、乳児用ミルク、離乳食、ベビーフード、ペットフード、動物用飼料、スポーツ食品、栄養補助食品、健康食品などに使用され得る。

【0092】本発明のリン酸化糖は、カルシウムの沈澱を防ぎ、植物体に速やかに吸収されることから、液体あるいは粉末の肥料、果実、切り花などの植物の日持ち向上剤として使用され得る。

【0093】本発明のリン酸化糖は、高温水系、非高温水系を問わず種々のスケール、ことにカルシウム系やマグネシウム系スケールの発生を防止または抑制し得るスケール防止剤として使用され得る。さらに必要により、他の公知の薬剤を併用してもよい。

【0094】本発明のリン酸化糖は、歯磨き剤、マウスウォッシュ、トローチ、うがい薬などに使用され得る。

【0095】本発明のリン酸化糖は、カルシウム、鉄、マグネシウムなどが含まれる飲み薬、入浴剤などの薬剤にも使用され得る。

【0096】

【作用】本発明は、これまで生理機能の全く知られていなかったリン酸化糖を製造し、その構造や作用について明らかにしたものである。このリン酸化糖の生理機能とは、生体に摂取される必要なミネラル（カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属または鉄）を、リン酸化糖が、それらミネラルを不溶化させることなく腸まで運搬し、これらのミネラルの吸収を促進させる効果を意味する。リン酸化糖の構造を分析した結果、馬鈴薯澱粉からグルコースを工業生産する時の廃液に存在するリン酸化糖の構造に等しいものが含まれることもまた判明した。本発明は、工業上の廃棄物に新たな機能を見いだしたものである。そして、資源の有効利用を考慮し、リン酸化糖の原料としての再利用をも可能とした。

【0097】

【実施例】本実施例のリン酸化糖の構造は以下のように分析した。

【0098】まず、リン酸化糖よりリン酸基を除去した。100 μ l の3%リン酸化糖溶液に100 μ l の10 mM塩化マグネシウムと0.3 mM塩化亜鉛、0.05%アジ化ナトリウムを含む60 mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.4）を混合し、これに100 μ l の30 U/mlのアルカリホスファターゼ（EC. 3.1.3.1; E.coli由来; シグマ社製）を添加して、40℃で18時間反応させた。限外濾過膜を用いてアルカリホスファターゼを除去することにより反応を停止し、リン酸基除去済の糖（以下、脱リン酸化糖と言う）を成分とする反応液（以下反応液Aという）を得た。

【0099】得られた反応液A 10 μ l に対し、10 μ l の200 mM酢酸緩衝液（pH 4.8）に溶解した5,000 U/mlの β -アミラーゼ（さつまいも由来; シグマ社製）を添加して、37℃で2時間保持した（以下、この液を反応液Bという）。同様に、反応液A 10 μ l に10 μ l の60 mM酢酸緩衝液（pH 4.5）に溶解した300 U/mlのグルコアミラーゼ（Rhizopus由来; 東洋紡績製）を添加して、35℃で18時間保持した（以下、この液を反応液Cという）。

【0100】反応液A～Cを分析して生成物を確認した。これらの反応液の分析は、陰イオン交換樹脂カラムCarboPac PA-100（ ϕ 4×250 mm、ダイオネックス社製）による高速液体クロマトグラフィーまたはシリカゲルを用いた薄層クロマトグラフィーによって、各種重合度の標準マルトオリゴ糖と比較することにより確認した。高速液体クロマトグラフィーを用いた脱リン酸化糖の溶出は、100 mMの水酸化ナトリウムを基本溶液として1 M酢酸ナトリウム濃度を上昇させることによって行なわれる。検出はパルスドアンペロメトリー（ダイオネックス社製）によった。薄層クロマトグラフィーによる脱リン酸化糖の分析は、脱リン酸化糖をアセトニトリル/水=80/20で多重展開した後、硫酸/メタノール=1/1の溶液を噴霧し、130℃で3分間保持することにより行なった。

【0101】反応液Aを分析することによりリン酸化糖の鎖長を確認した。反応液Bを分析したとき、マルトースのみ、あるいはマルトースとマルトトリオース（およびわずかにグルコース）が検出された。従って、この脱リン酸化糖はグルコースが α -1,4結合したグルカンであることを確認した。さらに反応液Cを分析したとき、グルコースのみが検出された。従って、この脱リン酸化糖は α -結合したグルコースからなることを確認した。

【0102】糖の平均鎖長（以下グルコースを1単位としてDPで表す。）は、脱リン酸化糖を構成する各重合度の糖含量から求めた。全リン酸化糖中の全糖量はフェノール硫酸法により定量し、結合リン酸基数は湿式灰化後、無機リン酸として定量される（澱粉関連糖質実験法、生物化学実験法19、中村道徳ら、31頁、1986年、学

会出版センター)。1分子当たりの結合リン酸基数は、湿式灰化後定量された無機リン酸量と、DPより下式を用いて算出した。

$$\begin{aligned} \text{(1分子当たりの平均結合リン酸基数)} = & \frac{\text{【湿式灰化後定量された無機リン酸(mol)】}}{\text{【全リン酸化糖中の全糖量(g)】/[DPから計算した脱リン酸化糖の平均分子量]}} \end{aligned}$$

【0104】(実施例1)馬鈴薯澱粉の1%溶液を、5mlの6mM塩化ナトリウムおよび2mM塩化カルシウムを含む溶液に溶解しつつ100℃まで迅速に温度上昇させて糊化した後、 α -アミラーゼ(フクタミラーゼ; 上田化学製)を35U作用させて、50℃で30分間保持した。この反応液を少量分取して0.2%糖溶液とし、0.01Mのヨウ素-ヨウ化カリウム溶液を1/10量添加しヨード呈色が陰性であることを確認後、プルラーゼ(林原生物化学研究所製)2Uとグルコアミラーゼ(東洋紡績製)6Uとを同時に40℃で20時間作用させた。反応を停止し、この溶液を、遠心分離後、上清を20mM酢酸緩衝液(pH4.5)で平衡化した陰イオン交換樹脂(キトパールBCW2501; 富士紡績製)に供した。十分に同緩衝液で洗浄して中性糖を除去し、続いて、0.5M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。各溶出画分をエバポレーターを用いて濃縮してから脱塩後、凍結乾燥することにより、リン酸化糖を得た。

【0105】(実施例2)実施例1により得たリン酸化糖を20mM酢酸緩衝液(pH4.5)で平衡化した陰イオン交換樹脂カラム(キトパールBCW2501)に再び供した。十分にカラムを同緩衝液で洗浄して中性糖を除去した。まず0.15M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で、次に0.5M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出する画分を集めた。上記の構造決定法に基づいて分析した結果、これらの画分を脱塩し凍結乾燥することで、0.15M塩化ナトリウム溶出画分からはグルコースが3個以上5個以下 α -1,4結合したグルカンにリン酸基が1個結合しているリン酸化糖(PO-1画分)が、0.5M塩化ナトリウム溶出画分からはグルコースが2個以上8個以下 α -1,4結合したグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖(PO-2画分)が得られた。

【0106】このリン酸化糖のリン酸基のグルコースへの結合位置の決定は、松作ら(Staerke, 22巻, 338~343頁, 1970年)の方法で6位の位置にあるか否かが決定できる。簡単に言えば、リン酸化糖は加水分解後に生じたグルコース-6-リン酸を酵素を用いて定量した。グルコース-6-リン酸は酸に安定であり、生成した量をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼで定量した。この方法でPO-1画分およびPO-2画分を分析した結果、PO-1画分では、約75%のリン酸基が6位に結合し、残りが3位または2位に結合していると考えられる。

【0103】
【数2】

えられる。PO-2画分では、リン酸基は6位にはほとんど結合していないと考えられる。

【0107】(実施例3)馬鈴薯澱粉1%溶液を、5mlの6mM塩化ナトリウムおよび2mM塩化カルシウムを含む溶液に溶解し100℃まで迅速に温度上昇させて糊化した後、 α -アミラーゼ(フクタミラーゼ)を35U作用させて、50℃で30分間保持した。沸騰浴中で5分間保持して反応を停止し、この溶液を、遠心分離後、上清を実施例1と同様に陰イオン交換樹脂カラムでリン酸化糖を回収して、脱塩し、凍結乾燥することで、リン酸化糖を得た。

【0108】(実施例4)10%化工澱粉(結合リン酸含量4%; 日澱化学製)500mlを分子量1万の限外濾過膜処理(ミリポア製; ペリコンラボカセット使用)し脱塩した後、 α -アミラーゼ(フクタミラーゼ)2500Uおよびグルコアミラーゼ(グルクザイムNL4.2; 天野製薬製)100Uを添加し50℃で180分反応させた後、沸騰浴中で5分間保持して反応を停止した。これをすぐに冷却し、3倍量エタノールを添加することによって生じた沈澱を遠心分離で回収した。つづいて、100gの活性炭を添加して中性糖を吸着除去し、膜濾過後、凍結乾燥することでリン酸化糖を得た。

【0109】(実施例5)5gの化工澱粉(結合リン酸含量4%)を100mlの1N塩酸溶液に溶解し、100℃で15分間加熱処理した。これをすぐに冷却し、1N水酸化ナトリウム溶液で中性にpHを調節した後脱塩した。続いて、50gの活性炭を添加して中性糖を吸着除去し、膜濾過した後凍結乾燥することでリン酸化糖を得た。

【0110】(実施例6)リン酸化糖のカルシウム、鉄、またはマグネシウムとの化合物形成能を、ゲル濾過法によっても確認した。実施例1のリン酸化糖10%溶液100 μ lに、100mM塩化カルシウム溶液100 μ lを添加し、20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を用いて平衡化したゲル濾過(セファデックスG-10; ファルマシア社製、 ϕ 1.2 \times 10cmカラム)に供した。その結果、リン酸化糖とカルシウムのピークが一致し、同時に溶出したので、そのリン酸化糖とカルシウムとの化合物を分取した。また、100mM塩化カルシウム溶液100 μ lも同カラムに供した。これらの溶出パターンを、図1に示した。塩化第一鉄や、塩化マグネシウムについても同様にカラムに供し、リン酸化糖の影響を調べた。これらを、図2、図3に示した。

【0111】ここで、図1は、以下の3種類の溶液によるゲル濾過溶出パターンを示す：実施例1の10%リン酸化糖100 μ lのみの溶液（溶出液をリン酸化糖濃度で測定；図中□で表す）；10%濃度リン酸化糖100 μ lと共に供した場合の100mM塩化カルシウム100 μ lの溶液（溶出液をカルシウム濃度で測定；図中●で表す）；および100mM塩化カルシウム100 μ lのみの溶液（溶出液をカルシウム濃度で測定；図中○で表す）。横軸に溶出時間、左の縦軸にリン酸化糖濃度を示し、そして右の縦軸に溶出したカルシウム濃度を示す。

【0112】図2は、以下の3種類の溶液によるゲル濾過溶出パターンを示す：実施例1の10%リン酸化糖100 μ lのみの溶液（溶出液をリン酸化糖濃度で測定；図中□で表す）；10%濃度リン酸化糖100 μ lと共に供した場合の100mM塩化第一鉄100 μ lの溶液（溶出液を鉄濃度で測定；図中●で表す）；および100mM塩化第一鉄100 μ lのみの溶液（溶出液を鉄濃度で測定；図中○で表す）。横軸に溶出時間、左の縦軸にリン酸化糖濃度を示し、そして右の縦軸に溶出した鉄濃度を示す。

【0113】図3は、以下の3種類の溶液によるゲル濾過溶出パターンを示す：実施例1の10%リン酸化糖100 μ lのみの溶液（溶出液をリン酸化糖濃度で測定；図中□で表す）；10%リン酸化糖100 μ lと共に供した場合の100mM塩化マグネシウム100 μ lの溶液（溶出液をマグネシウム濃度で測定；図中●で表す）；および100mM塩化マグネシウム100 μ lのみの溶液（溶出液をマグネシウム濃度で測定；図中○で表す）。横軸に溶出時間、左の縦軸にリン酸化糖濃度を示し、そして右の縦軸に溶出したマグネシウム濃度を示す。

【0114】これらより、リン酸化糖と金属塩とを同時に供した場合、金属塩はリン酸化糖と同じ溶出時間で溶出することが判った。金属塩とリン酸化糖とを同時に供した場合の溶出時間は、塩のみを供した場合の溶出時間とは明らかに異なっていた。従って、本実施例により、リン酸化糖のカルシウム、鉄、およびマグネシウムとの化合物形成について確認できた。

【0115】（実施例7）5mlの10mM酢酸緩衝液（pH5.5）中に溶解した1%馬鈴薯澱粉に、CGTase（コンチザイム；天野製薬製）20Uおよびイソアミラーゼ（林原生物化学研究所製）30Uを添加し、40℃で14時間反応させた後、沸騰浴中で5分間保持して反応を停止した。この溶液を遠心分離して得られた上清に100mM酢酸緩衝液を添加して、pH4.5に調整後、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換樹脂（キトパールBCW2501）カラムに供した。これを同緩衝液で十分に洗浄して中性糖を除去し、0.5M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。脱塩し、凍結乾燥す

ることにより、リン酸化糖を得た。

【0116】（実施例8）実施例2のPO-1画分を用いてリン酸化糖のタンパク質との誘導体を作製した。タンパク質として鶏卵由来オボアルブミン（シグマ社製）1mgと、実施例2のPO-1画分1mgとを混合し、70%の湿度下で50℃で一定期間保存した。この時のpHは8に調整した。0、2、4、8、12、16、20、および30日目にサンプリングした。グルコースおよびグルコース-6-リン酸もまた、同様に実施した。サンプリング後、これらを1mlの蒸留水に溶解し、遠心分離して沈澱を除去した後、メイラード反応の進行度として420nmでの着色度を測定した。その結果を図4に示した。

【0117】図4は、420nmでの着色度を測定することによる、以下の糖のタンパク質とのメイラード反応の結果を示す；実施例2のPO-1画分（420nmの吸光度で測定；図中◇で表す）；グルコース-6-リン酸（図中○で表す）；グルコース（図中△で表す）；およびコントロールとしてのタンパク質のみ（図中■で表す）。横軸に反応時間、そして縦軸に420nmでの吸光度を示す。

【0118】グルコース-6-リン酸を用いた場合は、反応は急速に進み、4日程度でピークに達し、次第に沈澱してしまうため溶液の着色度は一挙に低下した。それに比べて、PO-1画分を用いた場合は緩やかに進み、さらに、グルコースはさらにゆるやかに進んだ。

【0119】また、メイラード反応の進行度としてアミノ基の減少をTNBS法（京都大学農学部食品工学教室編食品工学実験書、養賢堂、620～621頁、1982年）を用いて測定した。この結果を図5に示す。

【0120】図5は、アミノ基の減少をTNBS法を用いて測定することによる、以下の糖のタンパク質とのメイラード反応の進行度を示す；実施例2のPO-1画分（アミノ基の減少をTNBS法で測定；図中◇で表す）；グルコース-6-リン酸（図中○で表す）；グルコース（図中△で表す）；およびコントロールとしてのタンパク質のみ（図中■で表す）。横軸に反応時間、そして縦軸に残存アミノ基率を示す。

【0121】図5によっても、図4と同様の結果が得られた。

【0122】（実施例9）さらに、オボアルブミンとPO-1とのメイラード反応について、PO-1の濃度を変えて実施した。簡単に言えば、オボアルブミン1mgに対してPO-1を4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0mgをそれぞれ実施例8の方法で7日間保存した。保存後、カルシウム可溶化効果を検証した。この結果を図6に示し、横軸に反応時に添加したPO-1量を探り、左の縦軸に可溶性カルシウムの百分率（図中では溶性カルシウム率と表示。以下の図もまた同様である）を示した。こ

こで、図中、□は1時間後の、◇は2時間後の、そして○は4時間後のPO-1の溶性カルシウム率を示した。ただし、図6では0mgのPO-1添加量0mgの値は示されていない。上記と同様にオボアルブミンの反応によって減少したアミノ基の量について、右の縦軸に残存量を百分率で示した(図中▲はTNBS%を示す)。アミノ基の量が減少し、反応が進むにつれて、カルシウム可溶化効果が現れた。また、反応が進むにつれてタンパク質の分子量は上昇しているのが、図7のSDS-電気泳動写真からよく判る。SDS-電気泳動はLaemliら(Nature、227巻、3831~3839頁、1970年)の方法で実施した。図中、両端のレーンは分子量マーカを示す。それぞれのレーンについて、添加PO-1量は以下の通りである：レーン1、0mg；レーン2、0.0625mg；レーン3、0.125mg；レーン4、0.25mg；レーン5、0.5mg；レーン6、1mg；レーン7、2mg；およびレーン8、4mg。図6および図7からオボアルブミン1mgに対して、PO-1を1mg反応させるのが最も効果的であり、結合PO-1量もこれ以上増加しないことが判った。

【0123】(実施例10) 10%の実施例1のリン酸化糖25 μ lに、10U/mlのCGTase(コンチザイム)5 μ lを添加し、37℃で15時間反応させた。その結果、実施例2のPO-1画分からPO-2に似た位置の画分(以下、PO-2様画分という)が生成することが判った。このPO-2様画分は、馬鈴薯澱粉から得た実施例2のPO-2画分とは異なる。これを以下に説明する。

【0124】実施例2のPO-2は、グルコースの6位に結合したリン酸基はほとんどなく、2~8の重合度のオリゴ糖にリン酸基が2個結合した構造である。しかし、実施例10におけるCGTaseによるPO-1の転移反応で生じた物質は、PO-1のうち重合度が4または5のオリゴ糖が転移反応のために(重合度3のリン酸化糖は転移しない)消失あるいは減少し、さらに重合度の高い、2個以上のリン酸基を有するリン酸化糖に変化している。これは上記の構造決定法に基づいて分析した結果、判明した。ただし、新たに生じたこの物質(PO-2に似た位置に検出される液体クロマトグラフィーでのピーク)は、ホスファターゼによる脱リン酸化が同様の条件では生じ難く、ホスファターゼに抵抗性のある物質に変化している。それでも、重合度が10程度までの中性糖が検出され、実施例2で得たPO-2とは異なる物質であることが確認された。

【0125】(実施例11) 酵母よりリン酸基の結合したマンナンをJeanesらの方法(Arch. Biochem. Biophys.、92巻、343頁~350頁、1961年)で調製した。5gのリン酸化マンナン(結合リン酸含量4%)を得た。

【0126】(実施例12) 得られたリン酸化糖のカルシウムとの化合物形成によるカルシウム可溶化効果につ

いて調べた。

【0127】カルシウム可溶化効果は、山本らの方法を改変して無機リン酸との沈澱形成阻害効果を調べることにより確認した(Biosci. Biotech. Biochem.、56巻、90~93頁、1992年)。

【0128】簡単に言えば、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lと試験溶液または蒸留水100 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃で0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0129】試験溶液として実施例1によって得られたリン酸化糖を用いたものを図8に、実施例2によって得られた重合度3~5のグルカンにリン酸基が1個結合しているリン酸化糖、および重合度2~8のグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖を用いたものを図9に、実施例4において得られたリン酸化糖を用いたものを図10に、カゼインホスホペプチド(CPPHI；明治製菓製)、ペクチンおよびアルギン酸ナトリウムを用いたものを図11に、グルコース-1,6-二リン酸、グルコース-6-リン酸、フラクトース-1,6-二リン酸、およびフラクトース-6-リン酸を用いたものを図12に示す。全図とも横軸に振盪時間、縦軸に可溶カルシウム率を示す。

【0130】図8では、実施例1において得られた1%リン酸化糖(図中●で表す)および5%リン酸化糖(図中○で表す)をそれぞれ100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に塩化カルシウム10mM溶液を400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪した後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0131】図9では、実施例2において得られたグルコースが3個以上5個以下 α -1,4結合したグルカンにリン酸基が1個結合しているリン酸化糖(図中●で表す)およびグルコースが2個以上8個以下 α -1,4結合したグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖(図中○で表す)各々5%の濃度に調整したものを100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0132】図10では、実施例4において得られたリン酸化糖を5%の濃度に調整したものの100 μ lと、6

mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0133】図11では、アルギン酸ナトリウム(図中□で表す)、ペクチン(図中●で表す)、CPPIII(明治製菓製)(図中○で表す)をそれぞれ5%濃度に調整したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0134】図12では、フラクトース-1,6-二リン酸(図中△で表す)、グルコース-6-リン酸(図中□で表す)、フラクトース-6-リン酸(図中○で表す)、グルコース-1,6-二リン酸(図中●で表す)それぞれを5%濃度に調整したもの100 μ l、および6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0135】これらの結果、リン酸化糖は、カルシウムと化合物もしくは錯体を形成し、腸内環境と同じ微アルカリ性においてもリン酸カルシウムとなってカルシウムが不溶化するのを阻害する効果を有することが明らかとなった。さらに、この効果は、リン酸化糖1分子当たり2個以上のリン酸基を有しているリン酸化糖および実施例4において調製したリン酸化糖において、特に優れていることが明らかとなった。

【0136】(実施例13)さらに、種々の物質のカルシウム可溶化効果がどの程度の濃度において現れるかについての試験を行った。試験溶液を0.1%、0.075%、0.05%、0.025%、0.01%、0.005%の各濃度に調整したものを100 μ l、および6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて2時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。試験溶液として、実施例2によって得られた重合度2~8のグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖を用いたものを図13に、実施例4において得られたリン酸化糖を用いた

ものを図14に、カゼインホスホペプチド(CPPII; 明治製菓製)(図中□で表す)またはアルギン酸ナトリウム(図中○で表す)を用いたものを図15に示す(アルギン酸ナトリウム、カゼインホスホペプチド(CPPIII[明治製菓製])).横軸はそれぞれの濃度について、10を底とする対数を取っている。縦軸に溶性カルシウム率を示す。

【0137】(実施例14)上記に加えて、グルコース-1,6-二リン酸、フラクトース-1,6-二リン酸、グルコース-6-リン酸におけるカルシウムの可溶化効果がどの程度の濃度において現れるかについての試験を行った。試験溶液をそれぞれ10mM、7.5mM、5mM、2.5mM、1mM、0.5mMの各濃度に調整したもの100 μ l、および6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液を400 μ lを添加して、30℃にて2時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した結果を図16に示す。

【0138】図16では、フラクトース-1,6-二リン酸(図中□で表す)、グルコース-6-リン酸(図中△で表す)、グルコース-1,6-二リン酸(図中○で表す)それぞれを10、7.5、5、2.5、1、0.5mMの各濃度に調整したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。横軸はそれぞれの濃度について、10を底とする対数を取っている。縦軸に溶性カルシウム率を示す。

【0139】実施例13および14により、本発明のリン酸化糖のカルシウム可溶化効果は、カゼインホスホペプチドやアルギン酸などのカルシウム可溶化効果と同程度であることが判った。

【0140】(実施例15)実施例8のリン酸化糖のタンパク質との誘導体のカルシウム可溶化効果もまた検証した。その結果を図17、18、および19に示した。全図とも横軸に反応時間、縦軸に溶性カルシウム率を示す。

【0141】図17では、図4に示した実施例2のPO-1画分のタンパク質とのメイラード反応産物の1%の濃度に調整したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5(図中△で表す)、1(図中□で表す)、および4(図中●で表す)時間振盪後、遠心分離(10,

000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0142】図18では、図4に示したグルコース-6-リン酸のタンパク質とのメイラード反応産物の1%の濃度に調整したもの100 μ l、および6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5(図中△で表す)、1(図中□で表す)、および4(図中●で表す)時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0143】図19では、図4に示したグルコースのタンパク質とのメイラード反応産物の1%の濃度に調整したもの100 μ l、および6mMアジ化ナトリウム、80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5(図中△で表す)、1(図中□で表す)、および4(図中●で表す)時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0144】実施例2のPO-1画分のリン酸化糖は、それ自体では、カルシウム可溶化効果が弱かったが、タンパク質に複数個結合することで強い可溶化効果が得られた。グルコース-6-リン酸のタンパク質との誘導体の可溶化効果は2時間以降消失するが、本発明のリン酸化糖誘導体は安定的に可溶化効果が現れることもまた判った。グルコースのタンパク質との誘導体ではカルシウム可溶化効果は起こらなかった。従って、カルシウム可溶化効果にはリン酸基の結合した糖類を用いることが必要であることが判った。

【0145】(実施例16)10%の実施例1のリン酸化糖25 μ lに、60mMの酢酸緩衝液に溶解した10U/mlのCGTase5 μ lを添加し、37℃で15時間反応させた結果、実施例2のPO-1画分からPO-2様画分が生成することが判った。この実施例9のリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を検証した。その結果を図20に示した。横軸に反応時間、縦軸に溶性カルシウム率を示す。図20では、以下のCGTaseを用いている：Bacillus. Thermophilic由来(図中□で表す)；Bacillus Circulans由来(図中◆で表す)；Bacillus Megaterium由来(図中○で表す)；市販のBacillus

s Macerans(図中△で表す)；Alkaline CGTase(T. Kometaniら、Biosci. Biotech. Biochem.、58巻、517-520頁、1994年)(図中■で表す)；およびコントロールとして60mM酢酸緩衝液(図中●で表す)。そして、リン酸化糖を1%の濃度に調整したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【0146】このPO-2様画分によってもカルシウムの可溶化効果は上昇した。このPO-2様画分は、分子内に2個以上のリン酸基が存在しているためにカルシウムの可溶化効果が上昇したと思われる。

【0147】(実施例17)実施例11のマノースからなるリン酸化糖のカルシウム可溶化効果もまた検証した。その結果を図21に示した。横軸に反応時間、縦軸に溶性カルシウム率を示す。それらリン酸化糖を1%の濃度に調整したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、4時間振盪後、遠心分離(10,000rpm、1分間)して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。本実施例により、構成糖に関係なくカルシウム可溶化効果は現れることが判った。

【0148】(実施例18)0.5、1、5、10mMの各金属塩化物溶液200 μ lに対し、1%の実施例1のリン酸化糖100 μ lを添加して混合した後に、500 μ lエタノールを添加して生成する沈殿の有無を目視により比較した。その結果を以下の表1に示す。これに500 μ lエタノールをさらに添加して同様に比較した。その結果を以下の表2に示す。

【0149】また、塩化カルシウム(図中○で表す)または塩化第一鉄(図中●で表す)を添加したときのリン酸化糖の回収率を図22に示した。横軸に各金属塩濃度、縦軸に沈殿としてのリン酸化糖回収率を示す。

【0150】

【表1】

金属塩化物の種類	0. 5 mM	1 mM	5 mM	1 0 mM
ナトリウム	-	-	-	-
カリウム	-	-	-	-
アンモニウム	-	-	-	-
マグネシウム	-	-	-	+
カルシウム	-	-	++	+++
バリウム	-	-	++	+++
銅(Ⅱ)	-	-	+	+
亜鉛	-	-	+	++
マンガン(Ⅱ)	-	-	+	++
鉄(Ⅱ)	-	-	+	+++
鉄(Ⅲ)	-	-	+++	-
コバルト(Ⅱ)	-	-	+	++
ニッケル	-	-	+	++
カドミウム	-	-	+	+++
ストロンチウム	-	-	++	+++
蒸留水	-	-	-	-

注) - 沈澱を認めない。 ++ 沈澱を認める。
+ 僅かに沈澱を認める。 +++ 顕著な沈澱を認める。

【0151】

【表2】

金属塩化物の種類	0. 5 mM	1 mM	5 mM	1 0 mM
ナトリウム	+	+	++	+++
カリウム	+	+	++	+++
アンモニウム	-	-	-	-
マグネシウム	+	+	++	+++
カルシウム	++	+++	+++	++
バリウム	+	+	+++	+++
銅(Ⅱ)	+	+	+	+
亜鉛	+	+	+++	+++
マンガン(Ⅱ)	+	+	+++	+++
鉄(Ⅱ)	+	+	++	+++
鉄(Ⅲ)	-	-	+++	++
コバルト(Ⅱ)	-	-	++	++
ニッケル	-	-	++	+++
カドミウム	+	+	++	+++
ストロンチウム	+	+	++	+++
蒸留水	-	-	-	-

注) - 沈澱を認めない。 ++ 沈澱を認める。
+ 僅かに沈澱を認める。 +++ 顕著な沈澱を認める。

【0152】（実施例19）鉄のキレート力については川上ら（Biosci. Biotech. Biochem., 57巻、1376-1377頁、1993年）の方法で試験した。即ち、100mMの塩化第一鉄、塩化第二鉄溶液25 μ lに、実施例1のリン酸化糖を最終溶液中で0、0.0125、0.025、0.125、0.25、0.5、1%のリン酸化糖濃度となるように加える。その後、200mM炭酸ナトリウム溶液でpHを7に調整し、さらに蒸留水を加え1ml溶液とした。その溶液を24、48時間、37℃で振盪後、遠心分離して上澄溶液の鉄濃度を原子吸光分析法で求めた。その結果を図23、図24に示した。両図とも横軸にリン酸化糖濃度、縦軸に初発の添加鉄量に対する可溶性鉄量の百分率を示す。

【0153】図23では、100mM塩化第一鉄25 μ lにリン酸化糖を最終溶液中で0、0.01、25、0.025、0.125、0.25、0.5、1%となるように添加し、200mM炭酸水素ナトリウム溶液でpH7に調整後1ml溶液とした。その溶液を24時間（図中○で表す）、48時間（図中●で表す）、37℃で振盪後、遠心分離して上澄液の鉄濃度を原子吸光分析法で求めた。

【0154】図24では、100mMの塩化第二鉄25 μ lにリン酸化糖を最終溶液中で0、0.0125、0.025、0.125、0.25、0.5、1%となるように添加し、200mMの炭酸水素ナトリウム溶液でpH7に調整後1ml溶液とした。その溶液を24時間（図中□で表す）、48時間（図中■で表す）、37℃で振盪後、遠心分離して上澄液の鉄濃度を原子吸光分析法で求めた。

【0155】本実施例により、リン酸化糖は、約0.1%の濃度で鉄イオンを可溶化する効果があることが判った。

（実施例20）虫歯の原因であるミュータンス菌による酸生成の有無を確認した。用いたミュータンス菌は、*S. mutans* 6715株を用いた。菌株をBrain Heart Infusion（DIFCO社製）で、24時間、37℃で静置培養後、同条件で、1リットル本培養した。遠心分離で菌体を集菌後、100mMのリン酸緩衝液（pH7.0）10mlに懸濁した（菌濃度0.2g/ml）。この溶液1.5mlと20mMの試験糖溶液1.5mlとを混合し、37℃で静置して、一定時間ごとに溶液のpHを測定した。用いた試験糖溶液は、実施例1のリン酸化糖（図中◇で表す）、シュクロース（図中△で表す）、マルトトライオース（図中□で表す）、およびグルコース（図中○で表す）である。その結果を図25に示した。横軸に反応時間、縦軸にpHの変化を示す。

【0156】本実施例により、リン酸化糖を用いた場合、溶液のpHがシュクロースやグルコースのように低下せず、酸が生成されないことが判った。すなわち、本発明のリン酸化糖はミュータンス菌に資化されないこ

とが判った。

【0157】（実施例21）リン酸化糖が、虫歯の原因であるミュータンス菌によって生産される酵素GTaseの基質として用いられて、グルカンを生成し得るかどうかを確認した。用いたGTaseは、*Streptococcus mutans* 6715株由来の酵素を用いた。150 μ MデキストランT-10（ファルマシア製）を200 μ lと100UのGTase100 μ lとを混合した後、500mMリン酸緩衝液（pH6.5）を200 μ lと500 μ lの試験糖溶液を添加し十分に混合した（全量1ml）。15時間、37℃で反応後遠心分離で沈澱を集め、蒸留水で沈澱を2～3回洗浄後、500 μ lの蒸留水に懸濁して、糖濃度をフェノール硫酸法で測定した。試験糖溶液は、実施例1のリン酸化糖を用い、反応溶液の終濃度で10、5、1、および0%に調製した。一方、コントロールとして5%シュクロース溶液を用いて、同様の試験も実施した。その結果を以下の表3に示した。

【0158】

【表3】

糖質	濃度 (%)	沈澱中の糖濃度 (%)
リン酸化糖	10	ND
	5	ND
	1	ND
	0	ND
	5	0.317
砂糖		

【0159】本実施例により、リン酸化糖は、それ自体GTaseの基質にはならず、グルカンを生成しないことが判った。

【0160】（実施例22）完全に加熱糊化した4%可溶性澱粉水溶液を4℃に保存すると、可溶性澱粉は速やかに老化し、糊液は白濁する。この系を用いて、澱粉の老化抑制効果を次のように検証した。可溶性澱粉を終濃度で4%になるように蒸留水に溶解後、実施例1のリン酸化糖（図中□で表す）を4%添加した。その溶液を4℃で保存して経時的に660nmでの白濁度を測定し、老化による沈澱の生成度を検証した。比較に澱粉老化防止効果があるといわれる日食化工（株）製のフジオリゴ#360（マルトトライオース60%以上）（図中△で表す）を用いた。また、ブランクとして蒸留水（図中●で表す）を用いた。その結果を図26に示した。横軸に反応時間、縦軸に白濁度（600nmでの吸光度）を示す。

【0161】本実施例により、リン酸化糖は、フジオリゴと比較しても澱粉の老化による濁度の生成が小さく、老化を抑制する効果が確認できた。

【0162】（実施例23）リン酸化糖の緩衝作用を次のように調べた。実施例1の1%リン酸化糖溶液30ml（図中○で表す）に対して、0.1N乳酸を1分間に0.4mlの割合で滴下して行き、pHの低下を経時的

に測定した。コントロールとして蒸留水30ml（図中◆で表す）に対して乳酸を滴下していった。その結果を図27に示した。横軸に添加乳酸量、縦軸にpHの変化を示す。

【0163】本実施例により、コントロールでは0.4mlの乳酸添加ですみやかにpHが3.5まで低下するのに対し、リン酸化糖に緩衝作用があり、pHの急激な変化を防止することが判った。

【0164】（実施例24）ラットを用いたカルシウムの出納実験は次のように行った。4週齢のSprague-Dawley系ラットを日本クレア（株）より購入し、個別ゲージにて、室温23.1±1.0℃、湿度55±7%、12時間ごとの明暗サイクルの環境で飼育した。初めの1週

間をAIN-76精製飼料で予備飼育した後、各群の体重が同じになるように3群（各6匹）に分けた。各群の試験食として、実施例1のリン酸化糖食群、実施例4のリン酸化糖食群、無添加のコントロール群に分けて5週間飼育した。食餌組成は以下の表4に示す。それぞれの飼料は、カルシウム0.35%、リン0.70%を含む大豆タンパク質（20%）をタンパク源とした精製飼料に、実施例1、実施例4のリン酸化糖を、対カルシウム重量比にして10倍量添加した（炭水化物の一部代替）ものを用いた。

【0165】

【表4】

	(g/100g diet)		
	群1	群2	群3
ISP*	20.0	20.0	20.0
Corn starch	66.9	63.4	63.4
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Cellulose powder	0.5	0.5	0.5
Vitamin mix.	0.8	0.8	0.8
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Mineral mix.**	4.0	4.0	4.0
CaCO ₃	0.4	0.4	0.4
CaHPO ₄	0.6	0.6	0.6
KH ₂ PO ₄	1.6	1.6	1.6
PO***	—	—	3.5
MS****	—	3.5	—

* ISP: 分離大豆タンパク質

** Mineral mix.: Ca and P free

*** PO: 実施例1 リン酸化糖

**** MS: 実施例4 リン酸化糖

最終濃度Ca; 0.35%, Pi; 0.7%

【0166】ラットの体重は、1週間に一度、飼料摂取量は2～3日に一度測定した。カルシウムの出納の測定および尿と糞便の回収は、実験終了前3日間に行った。群間の体重増加に差はなく、約360g程度であった。カルシウムの出納実験結果より得た吸収率を図28に示した。横軸にラット群、縦軸にカルシウム吸収率を示す。また、体内保留率を図29に示した。横軸にラット群、縦軸にカルシウム体内保留率を示す。

【0167】図28において、カルシウムの出納実験結果より得た吸収率は、採取した糞便を乾燥重量を測定した後、一定量を灰化して1N塩酸での抽出溶液を原子吸光分析でカルシウム量を求め、次式で計算したものである。

【0168】

【数3】

カルシウム吸収率＝

$$[(\text{摂取Ca量} - \text{糞便へのCa排泄量}) / \text{摂取量Ca量}] \times 100$$

【0169】図29において、採取した糞便は乾燥重量を測定した後、一定量を灰化して1N塩酸での抽出溶液

カルシウム体内保留率＝

$$[(\text{摂取Ca量} - \text{糞便へのCa排泄量} - \text{尿へのCa排泄量}) / \text{摂取量Ca量}]$$

$$\times 100$$

【0171】本実施例により、カルシウムの吸収率はリン酸化糖の投与によって上昇する傾向にあり、カルシウムの吸収促進効果が観察された。さらに、体内保留率も改善される傾向にあった。

【0172】（実施例24）リン酸化糖の消化性試験は、平山らの糖質消化性の簡易評価法（澱粉科学、37巻、第4号、259-262頁、1990年）に従って行った。簡単に言えば、ラットの小腸アセトン粉末（シグマ社製）に、蒸留水を添加して100mg/mlの懸濁液とした。超音波処理（SONIFIER cell disruptor：1% duty cycle 50、1分×3回）の後、遠心分離した上清を酵素液とした。その酵素液50μlと試験糖溶液50μlとを混合して37℃で0、5、10、30分、1、2、4、および22時間処理した。沸騰浴中で5分間処理して反応停止後、グルコースオキシダーゼ法（A. Dahlqvist, Anal. Biochem., 7巻、18-25頁、1964年）に従って生じたグルコースを定量し、消化性を検証した。試験糖液として、0.5%実施例1のリン酸化糖（図中●で表す）、実施例2のPO-2画分（図中■で表す）、グルコース-6-リン酸（図中△で表す）、パラチノース（図中◇で表す）、マルトトライオース（図中□で表す）の溶液を用いた。その結果を図30に示した。横軸に処理時間、縦軸に生成グルコース濃度を示す。

【0173】本実施例により、パラチノース、マルトトライオースに比べて、リン酸化糖は難消化性であることが判った。

【0174】（実施例25）実施例1で得たリン酸化糖を用いて、カーネーションの日持ち効果を調べた。カーネーション（コーラル種）の切り花各々6本を、20℃の室内（12時間明暗サイクル）で、以下の各水溶液300mlにそれぞれ生け、経過日数後の健全花数を調査した。本実施例で用いた水溶液の組成を以下の表5に示す。水としては脱イオン水を用いた。

【0175】

【表5】

No.	溶液組成
1	水
2	15mM 塩化カルシウム溶液
3	ハイボネックス溶液
4	15mM 塩化カルシウム+ハイボネックス溶液
5	ハイボネックス+1%リン酸化糖溶液
6	15mM 塩化カルシウム+ハイボネックス+1%リン酸化糖溶液

と尿のカルシウム量を原子吸光分析で求め、カルシウムの体内保留率は、次式で計算したものである。

【0170】

【数4】

No.	溶液組成
1	0.2% リン酸化糖（実施例1）溶液
2	1.5 mM 塩化カルシウム溶液
3	0.2% リン酸化糖 + 1.5 mM 塩化カルシウム溶液

【0176】調査は3、6、13日後に実施し、そのときに各水溶液を新しいものに取り替えた。結果を以下の表6に示す。

【0177】

【表6】

No.	健全花数			吸水量(ml)
	3日後	6日後	13日後	
1	3	1	1	245
2	5	3	2	235
3	5	5	5	280

【0178】リン酸化糖およびカルシウムの共存下では、13日後もほとんどの切り花が健全であり、効果が確認された。図31に6日後の切り花の状態を示す。最も健全なものと最も劣悪なもの2本を除いて撮影した。

【0179】（実施例26）実施例1で得たリン酸化糖を用いて、このリン酸化糖のかいわれ大根の生長への効果を調べた。かわいれ大根（ウタネ（株）製）の種20粒を、20℃の室内（12時間明暗サイクル）で、以下の水溶液30mlを添加した脱脂綿を敷いたシャーレ上に蒔き、9日後に脱脂綿上から根部分を切り取ることににより採取し、生長状態を観察した。リンを含有する肥料としてハイボネックス（村上物産（株））の1000倍希釈溶液を用いた。溶液は乾燥しないようにシャーレごと透明な密閉容器に置いた。本実施例で用いた水溶液の組成を以下の表7に示す。水としては脱イオン水を用いた。

【0180】

【表7】

【0181】採取したかいわれ大根は、伸長および重量を測定した。この測定結果を以下の表8に示す。

【0182】

【表8】

No.	平均伸長 (cm)	平均重 (g)
1	5.72	0.13
2	5.87	0.17
3	7.98	0.17
4	8.18	0.18
5	7.11	0.16
6	9.09	0.21

【0183】上記表8に示されるように、ハイボネックスとカルシウムのみとの組み合わせよりも、これにリン酸化糖を加えたものにおいて、良好な生長が観察され、効果が確認された。

【0184】(実施例27) 様々な糖質について化学的にリン酸化を試みた。グルコースまたはグルコース以外の構成糖からなる多糖であるキサンタンガム、タマリンドガム、グアガム、ローカストビーンガム、ジェランガム、フコイダン、寒天、デキストラン、およびマンナン、あるいは、環状オリゴ糖である α -シクロデキストリンについて、リン酸化澱粉の製造法である澱粉科学ハンドブック(二國二郎監修、朝倉書店、510~511頁、1977年)の方法でリン酸化を試みた。反応後、約40mlの脱イオン水に溶解した。各溶液の不溶物を遠心分離(8000rpm、20分)で除去後、透析で塩類を完全除去し、凍結乾燥した。各粉末試料を用いて、実施例11の方法でカルシウム可溶化効果を検証した。試料濃度は終濃度で0.5%とした。この結果を以下の表9に示す。この表には、振盪2時間後の添加カルシウムに対する可溶性カルシウムの率を示した。

【0185】

【表9】

各糖類における2時間後の 可溶性カルシウム率	
糖類	Soluble Ca (%)
キサンタンガム	61.4
タマリンドガム	100.0
グアガム	80.9
ローカストビーンガム	58.2
ジェランガム	29.2
フコイダン	53.7
α -シクロデキストリン	24.1
寒天	49.3
デキストラン	27.7
マンナン	90.7

【0186】未処理の糖質にはカルシウム可溶化効果が認められなかったが、処理後は表9に示したように効果が確認された。

【0187】

【発明の効果】本発明のリン酸化糖は、カルシウム、マ

グネシウムおよび鉄を必要とする成長期の子供、妊婦、あるいは病中病後の患者の食する食品、同様に動物、植物の配合飼料および肥料に適する。肥料、飼料、または食品として希釈せずにそのまま用いても、カルシウムおよびマグネシウムのようなアルカリ土類金属、および鉄などの吸収促進効果を発揮する。本発明のリン酸化糖は、天然物を由来とするために生体に有害となることはない。本発明のリン酸化糖は、難消化性であり、かつ低カロリーである。従って、このリン酸化糖はまた、多くのオリゴ糖に報告されているようにビフィズス菌増殖効果および整腸作用も期待できる。本発明のリン酸化糖はまた、生体に対して安全な洗浄剤および歯石防止剤としても好適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られたリン酸化糖溶液および塩化カルシウム溶液のゲル透過溶出パターンを示すグラフである。

【図2】実施例1で得られたリン酸化糖溶液および塩化第一鉄溶液のゲル透過溶出パターンを示すグラフである。

【図3】実施例1で得られたリン酸化糖溶液および塩化マグネシウム溶液のゲル透過溶出パターンを示すグラフである。

【図4】420nmでの着色度の測定により、実施例2で得られたリン酸化糖を含む種々の糖のタンパク質とのメイラード反応の進行度を示すグラフである。

【図5】アミノ基の減少をTNBS法を用いて測定することにより、実施例2で得られたリン酸化糖を含む種々の糖のタンパク質とのメイラード反応の進行度を示すグラフである。

【図6】実施例9におけるメイラード反応の結果得られるリン酸化糖のタンパク質との誘導体のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図7】実施例9のメイラード反応におけるタンパク質の分子量の変化を示す電気泳動写真である。

【図8】実施例1において得られたリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図9】実施例2において得られた重合度3~5のグルカンにリン酸基が1つ結合しているリン酸化糖および重合度が2~8のグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図10】実施例4において得られたリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図11】アルギン酸ナトリウム、ペクチン、およびCPPのカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図12】フラクトース-1,6-二リン酸、グルコース-6-リン酸、フラクトース-6-リン酸、およびグルコース-1,6-二リン酸のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図13】実施例2で得られた重合度2～8のグルカンにリン酸基が2個以上結合しているリン酸化糖の種々の濃度でのカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図14】実施例4において得られたリン酸化糖の種々の濃度でのカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図15】アルギン酸ナトリウムおよびカゼインホスホペプチドの種々の濃度でのカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図16】フラクトース-1, 6-二リン酸、グルコース-6-リン酸、およびグルコース-1, 6-二リン酸の種々の濃度でのカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図17】実施例2で得られたリン酸化糖のタンパク質との誘導体のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図18】グルコース-6-リン酸のタンパク質との誘導体のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図19】グルコースのタンパク質との誘導体のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図20】実施例10のリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図21】酵母より調製したマンノースを構成糖とする

リン酸化糖のカルシウム可溶化効果を示すグラフである。

【図22】実施例1のリン酸化糖の塩化カルシウムまたは塩化第一鉄の添加による回収率を示すグラフである。

【図23】実施例1のリン酸化糖の塩化第一鉄による鉄イオン可溶化効果を示すグラフである。

【図24】実施例1のリン酸化糖の塩化第二鉄による鉄イオン可溶化効果を示すグラフである。

【図25】実施例1のリン酸化糖を含む種々の糖のミュータンス菌による酸生成の結果を示すグラフである。

【図26】実施例1のリン酸化糖の澱粉の老化抑制効果を示すグラフである。

【図27】実施例1のリン酸化糖の緩衝作用を示すグラフである。

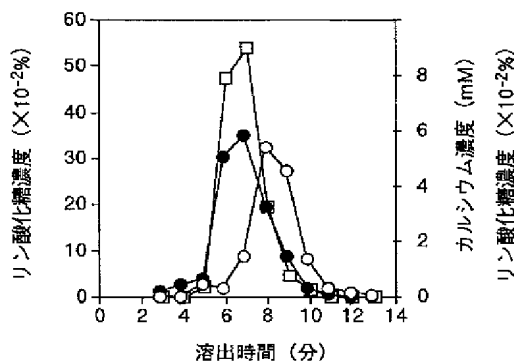
【図28】本発明のリン酸化糖のラットのカルシウム吸収率を示すグラフである。

【図29】本発明のリン酸化糖のラットのカルシウム体内保留率を示すグラフである。

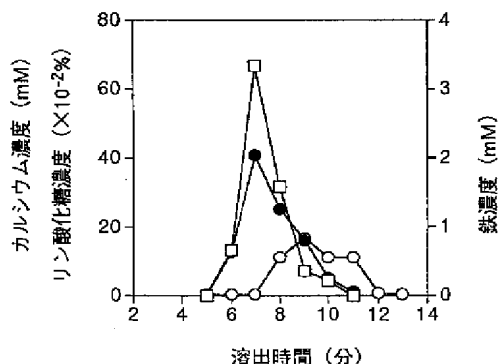
【図30】本発明のリン酸化糖の消化性試験の結果を示すグラフである。

【図31】本発明のリン酸化糖を処理した切り花の状態を示す生物生態写真である。

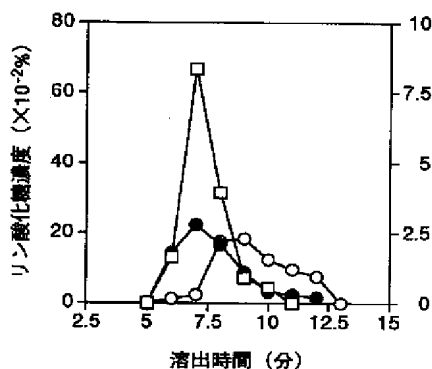
【図1】



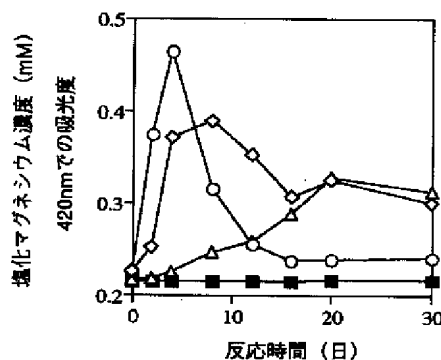
【図2】



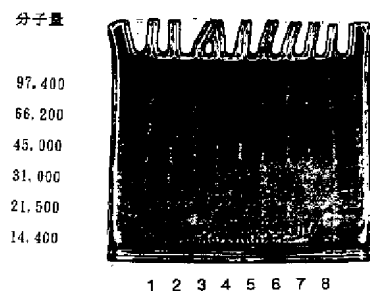
【図3】



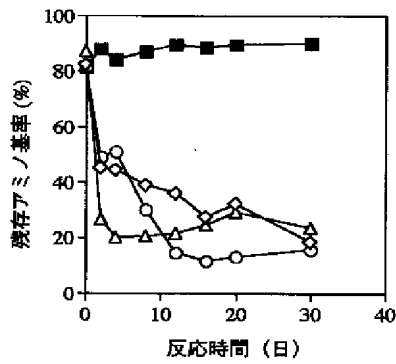
【図4】



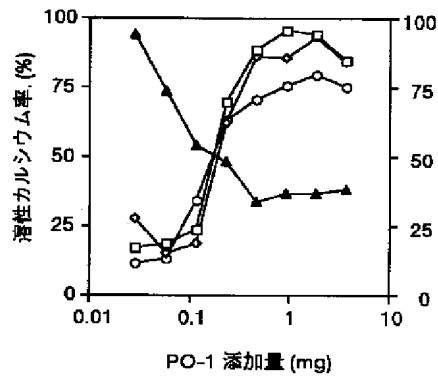
【図7】



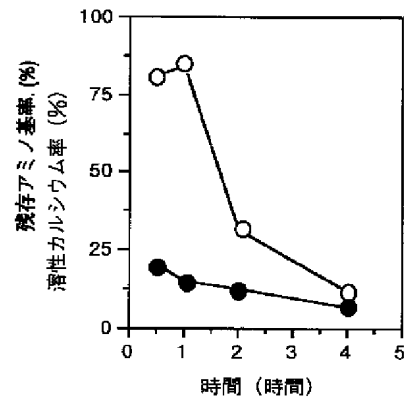
【図5】



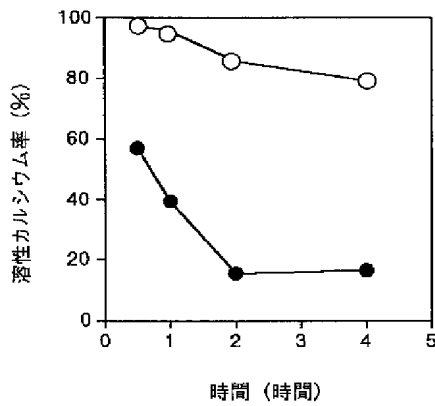
【図6】



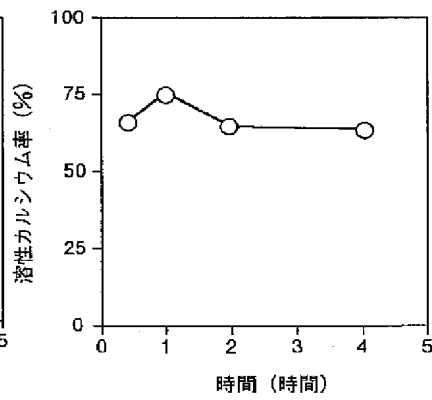
【図8】



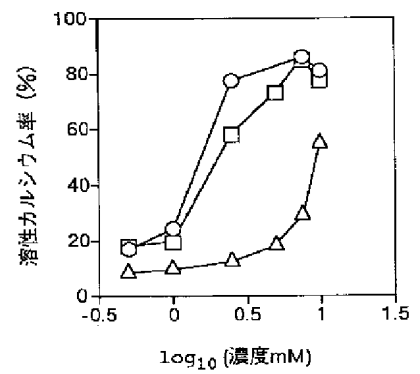
【図9】



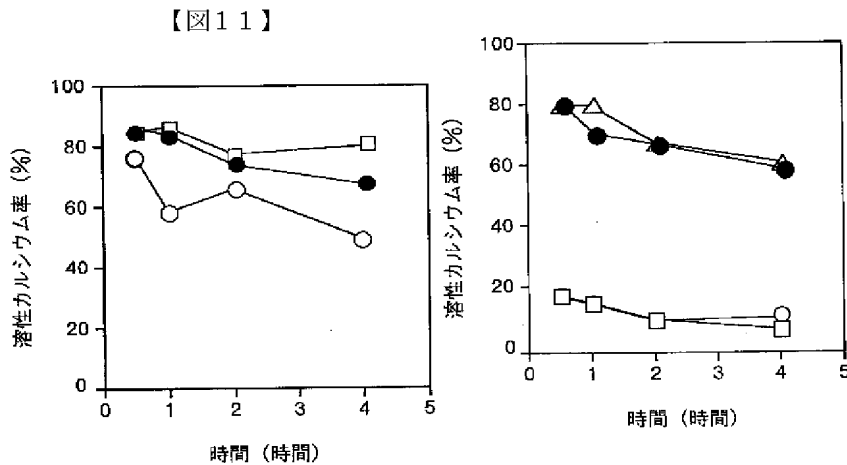
【図10】



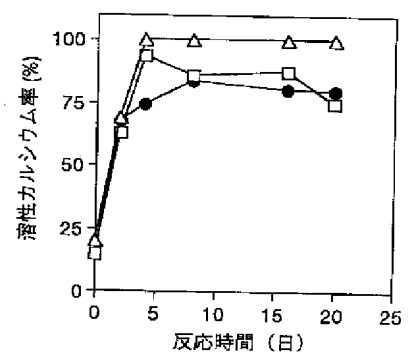
【図16】



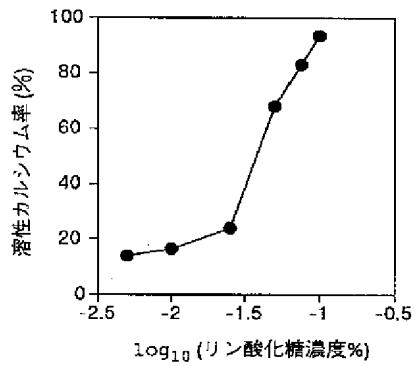
【図12】



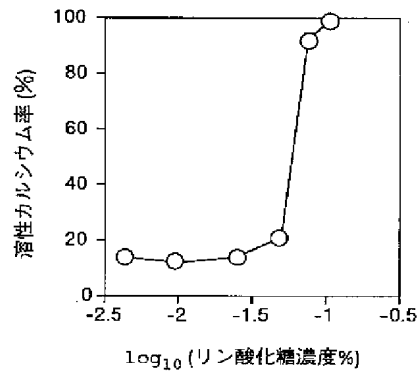
【図17】



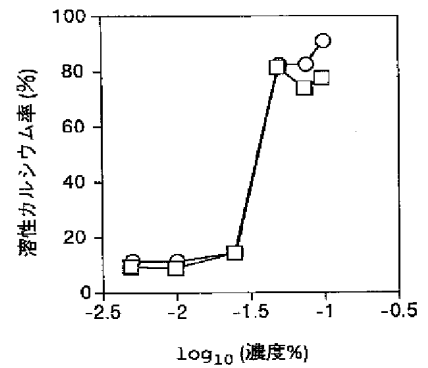
【図13】



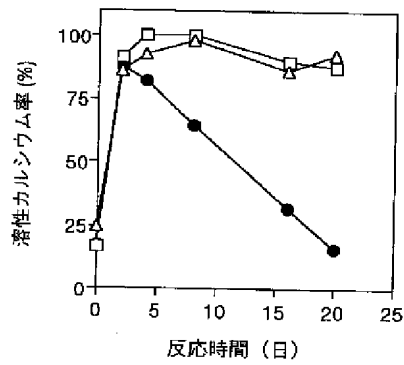
【図14】



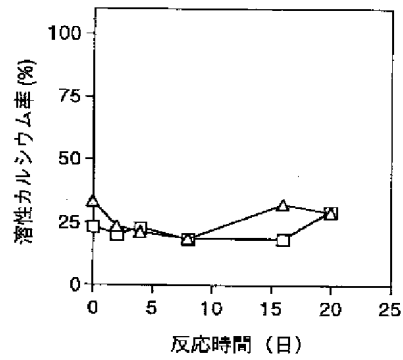
【図15】



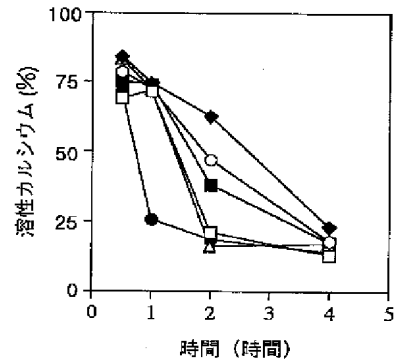
【図18】



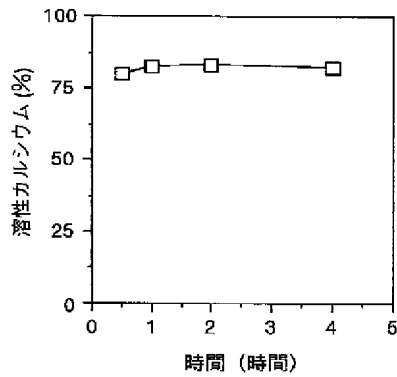
【図19】



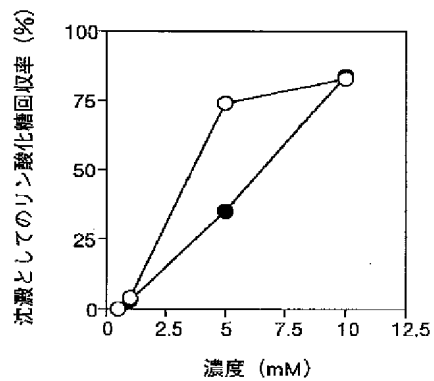
【図20】



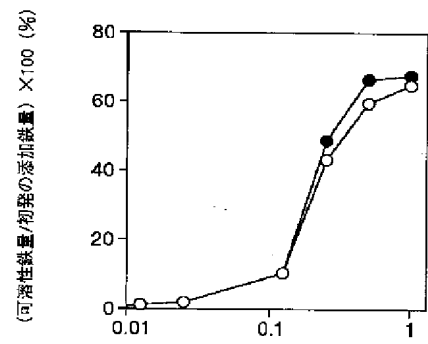
【図21】



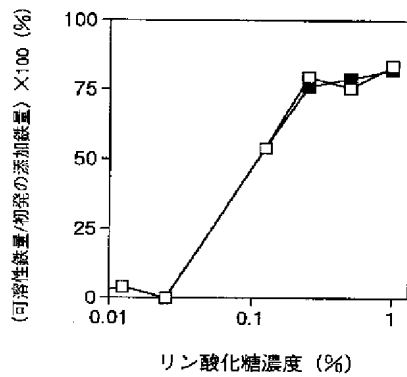
【図22】



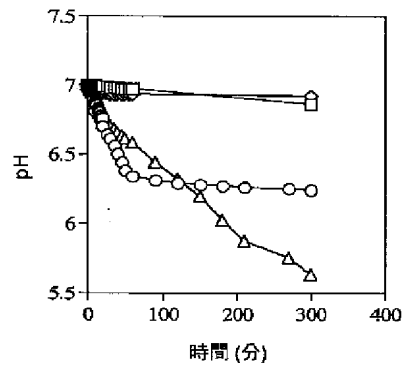
【図23】



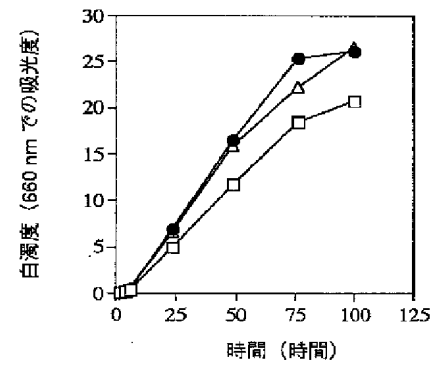
【図24】



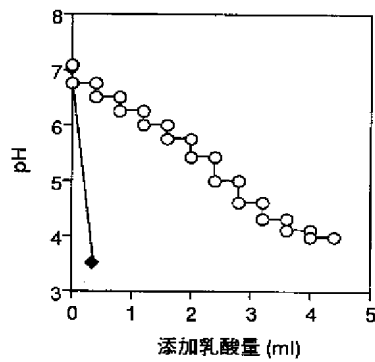
【図25】



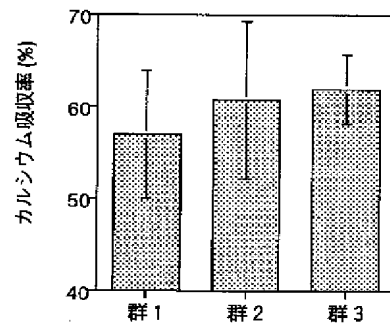
【図26】



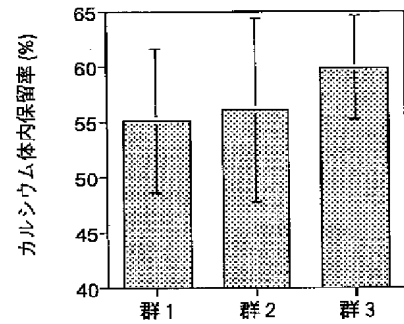
【図27】



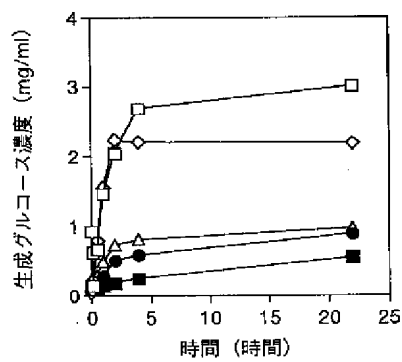
【図28】



【図29】



【図30】



【図31】



【手続補正書】

【提出日】平成7年11月9日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正内容】

【0086】本発明のリン酸化糖は、タンパク質あるいはペプチドと複合体を形成し得、リン酸化糖の誘導体とし得る。糖質のタンパク質とのメイラード反応を利用した複合体の作製は古くから行われてきた。このメイラード反応は、通常の食品調理中にも起こる反応であり、反応産物は生体に安全である。その反応は、糖質の還元性末端がタンパク質のアミノ基に脱水縮合することによって起こる。多糖の場合はタンパク質1分子に糖1～2分子が結合し、単糖の場合はほとんどのタンパク質のアミノ基に糖が結合することが可能である(A. Katoら、American Chemical Society、16巻、213～229頁、1991年)。また、その機能として、タンパク質の熱安定性およびpH安定性の向上、乳化特性の付与、あるいは水に不溶性のタンパク質の可溶化などが報告されている(A. Katoら、J. Agric. Food Chem.、39巻、1053～1056頁、1991年)。最近、グルコース-6-リン酸をタンパク質に結合させることにより、カルシウム可溶化効果が得られることもまた判った(T. Aokiら、Biosci. Biotech. Biochem.、58巻、9号、1727～1728頁、1994年)。しかし、単糖は反応性が高く、タンパク質の変性もまた起こるので、その効果および安定性は満足のいくものではない。また、本発明のリン酸化糖を用いたタンパク質との誘導体に関する報告も全く行われていない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正内容】

【0088】本発明のリン酸化糖により、肥料、飼料または食品の摂取におけるカルシウムの吸収を促進し得る。またリン酸化糖がカルシウムその他のアルカリ土類金属や鉄とも化合物または錯体を形成し、それらの生体への吸収を促進することが可能となる。アルカリ土類金属としては、カルシウムの他に、マグネシウムが挙げられる。従って、骨粗鬆症などのカルシウム不足からくる疾患の予防も期待できる。さらに今日、ダイエットや偏食の問題が大きく、嗜好食品においてもカルシウムと同様に鉄およびマグネシウムの有効な生体への吸収を考慮した食品が期待され、これらの吸収を促進する摂取方法を開発することは重要である。本発明のリン酸化糖またはリン酸化糖誘導体は、安全であり、難消化性であり、かつ低カロリーである。このリン酸化糖はまた、多くのオリゴ糖に報告されているようにビフィズス菌増殖効果

および整腸作用も期待できる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正内容】

【0122】(実施例9)さらに、オボアルブミンとPO-1とのメイラード反応について、PO-1の濃度を変えて実施した。簡単に言えば、オボアルブミン1mgに対してPO-1を4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0mgをそれぞれ実施例8の方法で7日間保存した。保存後、カルシウム可溶化効果を検証した。この結果を図6に示し、横軸に反応時に添加したPO-1量を探り、左の縦軸に可溶性カルシウムの百分率(図中では溶性カルシウム率と表示。以下の図もまた同様である)を示した。ここで、図中、□は1時間後の、◇は2時間後の、そして○は4時間後のPO-1の溶性カルシウム率を示した。ただし、図6では0mgのPO-1添加量0mgの値は示されていない。上記と同様にオボアルブミンの反応によって減少したアミノ基の量について、右の縦軸に残存量を百分率で示した(図中▲はTNBS%を示す)。アミノ基の量が減少し、反応が進むにつれて、カルシウム可溶化効果が現れた。また、反応が進むにつれてタンパク質の分子量は上昇しているのが、図7のSDS-電気泳動写真からよく判る。SDS-電気泳動はLaemmliら(Nature、227巻、3831～3839頁、1970年)の方法で実施した。図中、両端のレーンは分子量マーカーを示す。それぞれのレーンについて、添加PO-1量は以下の通りである：レーン1、0mg；レーン2、0.0625mg；レーン3、0.125mg；レーン4、0.25mg；レーン5、0.5mg；レーン6、1mg；レーン7、2mg；およびレーン8、4mg。図6および図7からオボアルブミン1mgに対して、PO-1を1mg反応させるのが最も効果的であり、結合PO-1量もこれ以上増加しないことが判った。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正内容】

【0139】実施例12、13および14により、本発明のリン酸化糖のカルシウム可溶化効果は、カゼインホスホペプチドやアルギン酸などのカルシウム可溶化効果と同程度であることが判った。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正内容】

【0145】（実施例16）10%の実施例1のリン酸化糖25 μ lに、60mMの酢酸緩衝液に溶解した10U/mlのCGTase5 μ lを添加し、37℃で15時間反応させた結果、実施例2のPO-1画分からPO-2様画分が生成することが判った。この実施例10のリン酸化糖のカルシウム可溶化効果を検証した。その結果を図20に示した。横軸に反応時間、縦軸に溶性カルシウム率を示す。図20では、以下のCGTaseを用いている：Bacillus. Thermophilic由来（図中□で表す）；Bacillus Circulans由来（図中◆で表す）；Bacillus Megaterium由来（図中○で表す）；市販のBacillus Macerans（図中△で表す）；Alkaline CGTase (T. Kometaniら、Biosci. Biotech. Biochem.、58巻、517-520頁、1994年）（図中■で表す）；およびコントロールとして60mM酢酸緩衝液（図中●で表す）。そして、リン酸化糖を1%の濃度に調製したもの100 μ lと、6mMアジ化ナトリウムおよび80mM塩化カリウムを含む20mMリン酸緩衝液（pH7.4）500 μ lとを十分に混合し、次に10mM塩化カルシウム溶液400 μ lを添加して、30℃にて0.5、1、2、および4時間振盪後、遠心分離（10,000rpm、1分間）して上澄液のカルシウム濃度を原子吸光分析法で測定した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正内容】

【0153】図23では、100mM塩化第一鉄25 μ lにリン酸化糖を最終溶液中で0、0.0125、0.025、0.125、0.25、0.5、1%となるように添加し、200mM炭酸水素ナトリウム溶液でpH7に調整後1ml溶液とした。その溶液を24時間（図中○で表す）、48時間（図中●で表す）、37℃で振盪後、遠心分離して上澄液の鉄濃度を原子吸光分析法で求めた。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0164

【補正方法】変更

【補正内容】

【0164】（実施例24）ラットを用いたカルシウムの出納実験は次のように行った。4週齢のSprague-Dawley系ラットを日本クレア（株）より購入し、個別ケージにて、室温23.1 \pm 1.0℃、湿度55 \pm 7%、12時間ごとの明暗サイクルの環境で飼育した。初めの1週間をAIN-76精製飼料で予備飼育した後、各群の体

重が同じになるように3群（各6匹）に分けた。各群の試験食として、実施例1のリン酸化糖食群、実施例4のリン酸化糖食群、無添加のコントロール群に分けて5週間飼育した。食餌組成は以下の表4に示す。それぞれの飼料は、大豆タンパク質（20%）をタンパク源としたカルシウム0.35%、リン0.70%を含む精製飼料に、実施例1、実施例4のリン酸化糖を、対カルシウム重量比にして10倍量添加した（炭水化物の一部代替）ものを用いた。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正内容】

【0184】（実施例27）様々な糖質について化学的にリン酸化を試みた。グルコースまたはグルコース以外の構成糖からなる多糖であるキサンタンガム、タマリンドガム、グアーガム、ローカストビーンガム、ジェランガム、フコイダン、寒天、デキストラン、およびマンナン、あるいは、環状オリゴ糖である α -シクロデキストリンについて、リン酸化澱粉の製造法である澱粉科学ハンドブック（二國二郎監修、朝倉書店、510～511頁、1977年）の方法でリン酸化を試みた。反応後、約40mlの脱イオン水に溶解した。各溶液の不溶物を遠心分離（8000rpm、20分）で除去後、透析で塩類を完全除去し、凍結乾燥した。各粉末試料を用いて、実施例12の方法でカルシウム可溶化効果を検証した。試料濃度は終濃度で0.5%とした。この結果を以下の表9に示す。この表には、振盪2時間後の添加カルシウムに対する可溶性カルシウムの率を示した。

【手続補正9】

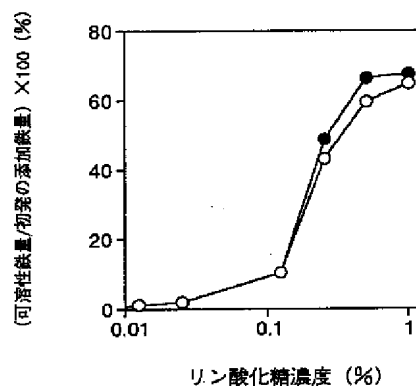
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図23

【補正方法】変更

【補正内容】

【図23】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶		識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P	19/14	Z	7432-4B		
	19/18		7432-4B		
	19/20		7432-4B		
	19/22		7432-4B		